



# **INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL**



## **CENTRO INTERDISCIPLINARIO DE INVESTIGACIÓN PARA EL DESARROLLO INTEGRAL REGIONAL**

### **DOCTORADO EN CIENCIAS EN BIOTECNOLOGÍA**

**Evaluación nutracéutica de los residuos de Orégano Mexicano y su  
aplicación en un modelo murino con Síndrome Metabólico.**

TESIS

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE DOCTORA EN CIENCIAS EN  
BIOTECNOLOGÍA

**PRESENTA:**

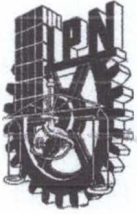
M.C. María Estela Frías Zepeda

**DIRECTORAS DE TESIS**

DC. Martha Rosales Castro

DC. Norma Paniagua Castro

Victoria de Durango, Dgo. julio de 2021



# INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL

## SECRETARIA DE INVESTIGACIÓN Y POSGRADO

### ACTA DE REGISTRO DE TEMA DE TESIS Y DESIGNACIÓN DE DIRECTOR DE TESIS

Ciudad de México, a 10 de junio del 2021

El Colegio de Profesores de Posgrado de IPN-CIIDIR Unidad Durango en su Sesión

(Unidad Académica)

Ordinaria No. 6 celebrada el día 02 del mes julio de 2018, conoció la solicitud presentada por el (la) alumno (a):

<b>Apellido Paterno:</b>	Frías	<b>Apellido Materno:</b>	Zepeda	<b>Nombre (s):</b>	María Estela
--------------------------	-------	--------------------------	--------	--------------------	--------------

Número de registro: B110225

del Programa Académico de Posgrado: Doctorado en Ciencias en Biotecnología

Referente al registro de su tema de tesis; acordando lo siguiente:

1.- Se designa al aspirante el tema de tesis titulado:

Evaluación nutraceutica de los residuos de orégano mexicano y su aplicación en modelo murino con síndrome metabólico

Objetivo general del trabajo de tesis:

Evaluar las propiedades nutraceuticas de los residuos de orégano mexicano en un modelo murino con síndrome metabólico.

2.- Se designa como Directores de Tesis a los profesores:

Director: Dra. Martha Rosales Castro 2° Director: Dra. Norma Paniagua Castro

No aplica:

3.- El Trabajo de investigación base para el desarrollo de la tesis será elaborado por el alumno en:

IPN- CIIDIR Unidad Durango

que cuenta con los recursos e infraestructura necesarios.

4.- El interesado deberá asistir a los seminarios desarrollados en el área de adscripción del trabajo desde la fecha en que se suscribe la presente, hasta la aprobación de la versión completa de la tesis por parte de la Comisión Revisora correspondiente.

Director(a) de Tesis  
  
Dra. Martha Rosales Castro

Aspirante  
  
María Estela Frías Zepeda

2° Director de Tesis (en su caso)

Dra. Norma Paniagua Castro

Presidente del Colegio

Dr. Eduardo Sánchez Ortiz



CENTRO INTERDISCIPLINARIO  
DE INVESTIGACIÓN PARA EL  
DESARROLLO INTEGRAL REGIONAL  
C.I.I.D.I.R.  
UNIDAD DURANGO  
I.P.N.



**INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL**  
**SECRETARÍA DE INVESTIGACIÓN Y POSGRADO**

SIP-14  
 REP 2017

**ACTA DE REVISIÓN DE TESIS**

En la Ciudad de Durango, Durango siendo las 18 horas del día 2 del mes de JUNIO del 2021 se reunieron los miembros de la Comisión Revisora de la Tesis, designada por el Colegio de Profesores de Posgrado de CIIDIR DURANGO para examinar la tesis titulada:

Evaluación nutracéutica de los residuos de Orégano Mexicano y su efecto en un modelo murino con síndrome metabólico del (ta) alumno (a):

Apellido Paterno:	<b>Frias</b>	Apellido Materno:	<b>Zepeda</b>	Nombre (s):	<b>Maria Estela</b>
-------------------	--------------	-------------------	---------------	-------------	---------------------

Número de registro: B1110225

Aspirante del Programa Académico de Posgrado: Doctorado en Ciencias en Biotecnología

Una vez que se realizó un análisis de similitud de texto, utilizando el software antiplagio, se encontró que el trabajo de tesis tiene 40 % de similitud. Se adjunta reporte de software utilizado.

Después que esta Comisión revisó exhaustivamente el contenido, estructura, intención y ubicación de los textos de la tesis identificados como coincidentes con otros documentos, concluyó que en el presente trabajo SI  NO  SE CONSTITUYE UN POSIBLE PLAGIO.

**JUSTIFICACIÓN DE LA CONCLUSIÓN:**

El 9% de la similitud encontrada corresponde al repositorioidigital.ipn.mx, con los formatos de portada, formato de tesis, Directoras de tesis, así como de algunas metodologías, las cuales están adecuadamente referidas

**\*\*Es responsabilidad del alumno como autor de la tesis la verificación antiplagio, y del Director o Directores de tesis el análisis del % de similitud para establecer el riesgo o la existencia de un posible plagio.**

Finalmente y posterior a la lectura, revisión individual, así como el análisis e intercambio de opiniones, los miembros de la Comisión manifestaron APROBAR  SUSPENDER  NO APROBAR  la tesis por UNANIMIDAD  o MAYORÍA  en virtud de los motivos siguientes:

Acuerdo unánime

Dra. Martha Rosales Castro  
 Director de Tesis  
 Nombre completo y firma

Dra. Martha Paniagua Castro  
 2º Director de Tesis (en su caso)  
 Nombre completo y firma

**COMISIÓN REVISORA DE TESIS**

Dr. Ignacio Villanueva Fierro  
 Nombre completo y firma

Dra. Martha G. Sosa Macías  
 Nombre completo y firma

Dr. Eduardo Lozano Guzmán  
 Nombre completo y firma

Dr. Eduardo Sánchez Ortiz  
 Nombre completo y firma

**PRESIDENTE DEL COLEGIO DE PROFESORES**

**CENTRO INTERDISCIPLINARIO DE INVESTIGACIÓN PARA EL DESARROLLO INTEGRAL REGIONAL C.I.I.D.I.R UNIDAD DURANGO I.P.N.**

Página 1 de 1





**INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL**  
**Secretaría de investigación y posgrado**

**CARTA CESIÓN DE DERECHOS**

En la ciudad de Durango, Dgo. El día 15 del mes de junio del año 2021 la que suscribe **María estela Frías Zepeda** alumna del programa de Doctorado en Ciencias en Biotecnología, con número de registro **B110225** adscrita al **Centro Interdisciplinario de Investigación para el Desarrollo Integral Regional Unidad Durango. CIIDIR-IPN Unidad Durango**. Manifiesta que es la autora intelectual del presente trabajo de tesis bajo la dirección de la **Dra. Martha Rosales Castro** y de la **Dra. Norma Paniagua Castro** y cede los derechos del trabajo titulado **“Evaluación nutracéutica de los residuos de Orégano Mexicano y su aplicación en un modelo murino con Síndrome Metabólico”**, al Instituto Politécnico Nacional para su difusión con fines académicos y de investigación.

Los usuarios de la información no deben de reproducir el contenido textual, gráficas o datos del trabajo sin el permiso expreso del autor y/o directores del trabajo. Este puede ser obtenido escribiendo a las siguientes direcciones: **estela2808@hotmail.com**, **mrciidirdgo@yahoo.com**, y **npaniag@hotmail.com**. Si el permiso se otorga, el usuario deberá dar el agradecimiento correspondiente y citar la fuente del mismo.



---

MARIA ESTELA FRIAS ZEPEDA

El presente trabajo de investigación, titulado “Evaluación nutracéutica de los residuos de Orégano Mexicano y su efecto en un modelo murino con Síndrome Metabólico”, se realizó en el laboratorio de fitoquímica del Centro Interdisciplinario de Investigación para el Desarrollo Integral Regional (CIIDIR-IPN) Unidad Durango y en el laboratorio de Farmacología del desarrollo de la Escuela Nacional de Ciencias Biológicas del Instituto Politécnico Nacional Unidad Zacatenco, bajo la dirección de las Doctoras Martha Rosales Castro y Norma Paniagua Castro respectivamente.

El trabajo experimental de células fue realizado en el laboratorio de cultivo celular de la Escuela Nacional de Homeopatía del Instituto Politécnico Nacional en la Cd. de México, se contó con el apoyo y supervisión de la Dra. Cynthia Ordaz Pichardo

Se recibió apoyo de CONACYT mediante la asignación de la beca escolar 421029

## **AGRADECIMIENTOS**

A Dios por estar siempre a mi lado y darme la fortaleza para seguir adelante.

Al Instituto Politécnico Nacional (IPN), Por las facilidades otorgadas para realizar mis estudios de doctorado y con ello contribuir a mi superación académica

A mis directoras de tesis, la Dra. Martha Rosales Castro y la Dra. Norma Paniagua Castro. Por trasmitirme sus valiosos conocimientos y su apoyo en todas mis dudas.

A mis asesores Dr. Ignacio Villanueva Fierro y Dr. Eduardo Lozano Guzmán, por sus aportaciones y apoyo para la realización de este trabajo.

A todas las personas, que de una forma u otra me brindaron sus conocimientos.

A mi familia que me ha apoyado en la realización de mis proyectos.

## ÍNDICE

<b>GLOSARIO DE TÉRMINOS</b>	<b>i</b>
<b>LISTA DE ACRÓNIMOS</b>	<b>ii</b>
<b>RELACIÓN DE FIGURAS</b>	<b>iv</b>
<b>RELACIÓN DE CUADROS</b>	<b>vi</b>
<b>RESUMEN</b>	<b>vii</b>
<b>ABSTRACT</b>	<b>viii</b>
<b>1. INTRODUCCIÓN</b>	<b>1</b>
<b>2. ANTECEDENTES</b>	<b>3</b>
2.1 Principal función de un alimento	3
2.2 Nuevos alimentos	3
2.3 Alimento funcional	4
2.4 Nutracéutico	5
2.4.1 Clasificación de los nutracéuticos	5
2.4.2 Diferencia entre alimento funcional, nutracéutico y medicamento	6
2.4.3 Demanda de alimentos funcionales y nutracéuticos	6
2.5 Antioxidantes	8
2.5.1 Polifenoles	12
2.6 Síndrome Metabólico	14
2.6.1 Obesidad	17
2.6.1.1 Clasificación de la obesidad	18
2.6.2 Leptina	21
2.6.3 Diabetes Mellitus	24
2.6.4 Resistencia a la Insulina (RI)	27
2.6.5 Dislipidemia	29
2.6.6 Hipertensión Arterial	30
2.7 Orégano	32
2.7.1 Descripción del orégano	34
2.7.2 Composición química del orégano	36

2.8 Uso de residuos vegetales con potencial nutracéutico	38
<b>3. JUSTIFICACIÓN</b>	<b>39</b>
<b>4. HIPOTESIS</b>	<b>40</b>
<b>5. OBJETIVOS</b>	<b>41</b>
5.1 OBJETIVO GENERAL	41
5.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	41
<b>6. MATERIALES Y MÉTODOS</b>	<b>42</b>
6.1 Materiales	42
6.1.1 Colecta de hojas y tallos de <i>Lippia graveolens</i>	42
6.2 Métodos	42
6.2.1 Obtención de extractos	43
6.2.1.1 Determinación de rendimientos	43
6.2.1.2 Determinación del contenido de Fenoles Totales (FT)	44
6.2.1.3 Determinación de Flavonoides Totales (FL)	45
6.2.1.4 Evaluación de capacidad antioxidante mediante DPPH	45
6.2.1.5 Evaluación de capacidad antioxidante mediante ABTS	46
6.2.1.6 Evaluación de la capacidad antioxidante mediante FRAP	47
6.3 Evaluación de la actividad inhibitoria <i>in vitro</i> de las enzimas $\alpha$ -amilasa y $\alpha$ -glucosidasa en los extractos de hojas y tallos	48
6.3.1 Inhibición de la enzima $\alpha$ -amilasa	48
6.3.2 Inhibición de la enzima $\alpha$ -glucosidasa	49
6.4 Identificación de polifenoles en los extractos de hoja y tallo de orégano mexicano.	49
6.4.1 Comparación cualitativa de los compuestos fenólicos de los extractos de hoja y tallo del orégano mexicano mediante HPLC-DAD.	50
6.4.2 Identificación de compuestos fenólicos por UPLC-ESI-MS	50
6.5 Animales de experimentación	51
6.5.1 Evaluación del efecto toxicológico y citotóxico de los extractos.	52
6.5.2 Evaluación de dosis letal media (DL50) Toxicidad aguda	52
6.5.3 Evaluación citotóxica <i>in vitro</i>	53



6.6 Evaluación del efecto de los extractos sobre marcadores bioquímicos en ratones con SM.	55
6.6.1 Obtención de crías e inducción del SM	55
6.7 Presión arterial	57
6.8 Curva de tolerancia a la glucosa	57
6.9 Pruebas Bioquímicas	57
6.10 Obtención y análisis de las muestras de tejido	58
6.10.1 Medidas antropométricas	58
6.10.2 Obtención de grasa	58
6.10.3 Ensayo de peroxidación	58
6.11.- Análisis estadístico	58
<b>7. RESULTADOS</b>	<b>60</b>
7.1 Extractos y rendimiento	60
7.1.1 Evaluación de extractos	60
7.1.2 Evaluación antioxidante <i>in vitro</i>	63
7.2 Evaluación de la inhibición $CI_{50}$ de la enzima $\alpha$ -amilasa	66
7.3 Evaluación de la inhibición $CI_{50}$ de la enzima $\alpha$ -glucosidasa	67
7.4 Identificación de metabolitos mediante cromatografía	68
7.4.1 Comparación cualitativa de los compuestos fenólicos por HPLC-DAD	68
7.4.2 Compuestos identificados por UPLC- ESI-MS	72
7.6 Evaluación toxicológica	74
7.6.1 Toxicidad aguda $DL_{50}$ con extractos hidroetanólicos de hoja y tallo de <i>Lippia graveolens</i> en modelo murino	74
7.6.2 Evaluación citotóxica por la técnica MTT	75
7.7 Pesos de los ratones hembras.	76
7.8 Efecto de los extractos sobre marcadores	78
7.8.1 Actividad hipoglucemiante	78
7.8.2. Evaluación de presión arterial, colesterol, triglicéridos, cHDL, lipoperoxidación, hormonas insulina y leptina.	80
<b>8. DISCUSIÓN</b>	<b>82</b>
8.1 Evaluación de extractos	82

8.2 Identificación HPLC-DAD	83
8.3 Evaluación de la inhibición de las enzimas $\alpha$ -amilasa y $\alpha$ -glucosidasa	84
8.4 Evaluación toxicológica	85
8.4.1 Determinación de DL <sub>50</sub>	85
8.4.2 Evaluación citotóxica <i>in vitro</i>	85
8.5 Evaluación de la actividad biológica en marcadores bioquímicos relacionados con el SM	87
<b>9. CONCLUSIONES</b>	<b>91</b>
<b>10. RECOMENDACIONES</b>	<b>92</b>
<b>11. BIBLIOGRAFIA</b>	<b>93</b>

## GLOSARIO DE TÉRMINOS

**Ciclofosfamida.** - Es un agente quimioterapéutico utilizado para tratar diferentes tipos de cáncer, incluyendo linfomas, leucemias, mieloma, cáncer de pulmón y cáncer de mama.

**Cisplatino.** - Medicamento que se usa solo o con otros medicamentos para el tratamiento de ciertos tipos de cáncer de vejiga, de ovario y de testículo. También está en estudio para el tratamiento de otros tipos de cáncer. El cisplatino daña el ADN de las células. Es un tipo de compuesto de platino.

**Carboximetilcelulosa (CMC).** - Se emplea para recubrimientos de tabletas con altos grados de pureza y baja viscosidad. La CMC es insoluble en el ambiente ácido del estómago, pero soluble en el medio básico del intestino. También es utilizada como formador de geles, portador del medicamento, desintegrador de la tableta y estabilizador para suspensiones y emulsiones.

**Glutamato monosódico.** - El glutamato es un aminoácido, cuya función en el Sistema Nervioso Central consiste en facilitar y agilizar la comunicación entre las células nerviosas. El glutamato, en forma de sal monosódica (glutamato monosódico) se utiliza como conservador en diversos alimentos, principalmente enlatados, saborizante y administrado en animales recién nacidos origina algunas patologías relacionadas con el Síndrome Metabólico

**Síndrome Metabólico (SM).** - Se define como una asociación de problemas de salud causados por factores genéticos y ambientales que pueden aparecer de forma simultánea o secuencial en un mismo individuo, y que tienen como componente patogénico fundamental la resistencia a la insulina.

## LISTA DE ACRÓNIMOS

ABTS	Acido 2,2'-azino-bis-(3-etilbenzotiazolina)-6-sulfónico
ADN	Ácido desoxirribonucleico
ATP-III	Panel de tratamiento para el adulto
CT	Colesterol Total
DM	Diabetes mellitus
DM2	Diabetes mellitus tipo II
DMC	Dimetil Carboximetil Celulosa
DPPH	2,2- difenil-2-picrilhidrazil
ECV	Enfermedad Cardiovascular
EGIR	Grupo Europeo para el estudio de la insulino resistencia
ERN	Especies Reactivas de Nitrógeno
EROS	Especies Reactivas del Oxígeno
FID	Federación Internacional de Diabetes
FT	Fenoles Totales
FL	Flavonoides Totales
FRAP	Poder Antioxidante Reductor del Hierro
GMS	Glutamato monosódico
HDL	Lipoproteínas de Alta Densidad
HGNA	Hígado graso no alcohólico
HTA	Hipertensión Arterial
IMC	Índice de Masa Corporal
IR	Insulino resistencia
MAD	Malondialdehído
OMS	Organización Mundial de la Salud
PA	Presión Arterial
ROS	Especies Reactivas de Oxígeno
SM	Síndrome metabólico
SNC	Sistema Nervioso Central

TA	Tejido Adiposo
TAB	Tejido Adiposo Blanco
TAM	Tejido Adiposo Marrón
TFG- $\beta$	Factor de Crecimiento $\beta$
TG	Triglicéridos
TNF $\alpha$	Factor de Necrosis Tumoral $\alpha$

## RELACIÓN DE FIGURAS

1	Formación de un radical libre por la pérdida de un electrón	8
2	Estructura básica de los flavonoides	12
3	Clasificación de los polifenoles en función del número de anillos de fenol que contienen	13
4	Distribución de género en individuos con y sin SM	16
5	Distribución etaria con SM según la FID	16
6	Señalización intracelular de la leptina a través de la vía JAK2/STAT3 y PI3K-PDE-cAMP	23
7	Mecanismos celulares que interfieren en la señalización de la insulina	28
8	Mecanismos fisiopatológicos de aterosclerosis relacionadas con el SM	30
9	Mapa de distribución de especies de orégano mexicano en México	32
10	Mapa de distribución de especies de orégano mexicano, en el estado de Durango	33
11	Imagen de la planta de orégano mexicano <i>Lippia graveolens</i> H.K.B.	34
12	Estructura química de los principales componentes del aceite de orégano mexicano	35
13	Estructura química de compuestos detectados en el extracto de acetato de etilo del tallo de <i>Lippia graveolens</i> H.K. B	36
14	Determinación de sólidos en hojas y tallos de orégano mexicano <i>Lippia graveolens</i> H.K.B.	57
15	Contenido de fenoles totales de extractos hidroetanólicos en hoja y tallo de orégano mexicano	58
16	Contenido de Flavonoides totales de extractos hidroetanólicos en hoja y tallo de orégano mexicano <i>Lippia graveolens</i> H.K.B.	59
17	Relación de la CI <sub>50</sub> del efecto del DPPH en hoja y tallo de extractos hidroetanólicos de orégano mexicano	61
18	Evaluación antioxidante <i>in vitro</i> mediante la técnica FRAP	62
19	Evaluación antioxidante <i>in vitro</i> mediante la técnica ABTS	63
20	Determinación de la CI <sub>50</sub> para inhibir la enzima $\alpha$ -amilasa en los extractos hidroetanólicos de hoja y tallo del orégano mexicano	64
21	Determinación de la CI <sub>50</sub> para inhibir la enzima $\alpha$ -glucosidasa en los extractos hidroetanólicos de hoja y tallo del orégano mexicano	65
22	Cromatogramas de extractos hidroetanólicos de hoja del orégano mexicano a 280 nm	67

---

23	Cromatogramas de extractos hidroetanólicos de tallo del orégano mexicano a 280 nm	68
24	Análisis de conglomerados mediante algoritmo UPGMA	69
25	Algunas estructuras moleculares encontrados en residuos de hoja y tallo de orégano mexicano	71
26	Determinación del porcentaje de viabilidad para SK-LU-1 entre tratamientos de hoja y tallo y control a las 24h y 48 h	72
27	Efecto citotóxico de extractos hidroetanólicos de Hoja y tallo de <i>Lippia graveolens</i> para células HFF-1	73
28	Peso corporal de los ratones hembras con diferentes tratamientos	74
29	Porcentaje de grasa corporal	74
30	Curva de tolerancia a la glucosa en ratones hembras CD1	78
31	Área bajo la curva de la tolerancia a la glucosa en ratones hembra CD1	79

## RELACIÓN DE CUADROS

1	Estructuras celulares alteradas por EROS	9
2	Clasificación de los antioxidantes según su naturaleza	11
3	Criterios de diagnóstico para el SM y su tratamiento	15
4	Alteraciones ocasionadas por la obesidad	17
5	Resultados de la determinación de % de sólidos totales, FT y FL	60
6	Algunos polifenoles identificados en los extractos de hoja y tallo	70
7	Medidas antropométricas de los ratones hembra	75
8	Valores de marcadores en ratones hembra CD1	78



## RESUMEN

El término “nutracéutico” es una palabra compuesta que se deriva de nutrición y farmacéutico, hace referencia a todos aquellos alimentos, o productos vegetales naturales, que han demostrado científicamente proporcionar beneficios a la salud. Una fuente importante para el estudio de nuevos productos nutracéuticos son las plantas medicinales o sus residuos, cuyo efecto terapéutico se asocia a la diversidad de metabolitos secundarios que contienen. En el presente trabajo se evaluó la composición fenólica de extractos hidroetanólicos de hojas de orégano mexicano (*Lippia graveolens*) que se generan como residuo después de la extracción del aceite esencial, y de los tallos, considerados material secundario sin valor. Se obtuvieron extractos con tres concentraciones de etanol/agua y tres relaciones masa/volumen de extracción, se evaluó el rendimiento en sólidos, la concentración de fenoles totales, flavonoides, capacidad antioxidante *in vitro*, y se identificaron sus principales compuestos mediante UPLC-MS. Para determinar el efecto biológico de los extractos se evaluó la inhibición *in vitro* en enzimas  $\alpha$ -amilasa y  $\alpha$ -glucosidasa, y el efecto *in vivo* en ratones CD1, a los que se les indujo previamente síndrome metabólico con glutamato monosódico vía intradérmica. Se evaluó también el efecto toxicológico y citotóxico de los extractos. Los resultados indican que las mezclas etanol/agua en proporción 50/50 y 80/20, a una relación m/v de 1/30 fueron las más efectivas para la extracción de los compuestos fenólicos, de los cuales los flavonoides naringenina, taxifolina y eriodictiol se encontraron en mayor concentración. Los extractos de tallos mostraron mayor actividad biológica respecto a los de hojas. Se presentó un efecto favorable en los parámetros antropométricos y bioquímicos analizados en los ratones. Los extractos no producen efectos tóxicos a dosis elevadas (mayores a 2000 mg/kg), y tienen alta inhibición en células tumorales SK-KU-1 (cáncer de pulmón), sin evidencia de un nivel de toxicidad elevado en la línea celular HFF-1 empleada como control. Por todo lo anterior, los residuos de orégano mexicano son viables para utilizarse en la obtención de extractos, a partir de los que se pueden elaborar productos nutracéuticos.

**Palabras clave:** Hojas, tallos, *Lippia graveolens* HBK, orégano mexicano, residuos, nutracéuticos, polifenoles, síndrome metabólico.

## ABSTRACT

Nutraceutical is a word that is derived from nutrition and pharmaceutical, it refers to foods, or natural plant products, that have been scientifically evaluated to provide health benefits. An important source for the study of new nutraceutical products are medicinal plants or their residues, whose therapeutic effect is associated with the diversity of their secondary metabolites. In the present work, the phenolic composition of hydroethanolic extracts of Mexican oregano leaves (*Lippia graveolens*), that are generated as residue after extraction of the essential oil, and of the stems, considered secondary material of no value, was evaluated. Extracts were obtained with three concentrations of ethanol/water and three mass/volume extraction ratios. The yield, the concentration of total phenols, flavonoids, and antioxidant capacity *in vitro* were evaluated, and their main compounds were identified by UPLC-MS. To determine the biological effect of the extracts, the *in vitro* inhibition of  $\alpha$ -amylase and  $\alpha$ -glucosidase enzymes was evaluated, as well as the *in vivo* effect in CD1 mice, which were induced metabolic syndrome previously with monosodium glutamate intradermally. The toxicological and cytotoxic effect of the extracts was also evaluated. The results indicate that the 50/50 and 80/20 ethanol/water mixtures, at ratio 1/30 w/v, were the most effective for the extraction of phenolic compounds, of which the flavonoids naringenin, taxifolin and eriodictiol were found in higher concentration. The stem extracts showed higher biological activity compared to the leave extracts. There was a favorable effect on the anthropometric and biochemical parameters analyzed in the mice. The extracts do not produce toxic effects at high doses (greater than 2000 mg/kg), and have high inhibition in SK-KU-1 tumor cells (lung cancer), without evidence of a high level of toxicity in the HFF-1 cell line used as a control. For all the above, the residues of Mexican oregano are viable to be used in obtaining extracts, from which nutraceutical products can be made.

**Keywords:** Leaves, stems, *Lippia graveolens* HBK, Mexican oregano, residues, nutraceuticals, polyphenols, metabolic syndrome.

## 1. INTRODUCCIÓN

Los nutraceuticos son sustancias biológicas extraídas de fuentes naturales que se caracterizan mediante procesos biotecnológicos anti desnaturalizantes para conservar sus propiedades originales, sin hacer ningún tipo de manipulación química (Suárez *et al.*, 2018).

Una vez extraídos de su fuente natural, estas sustancias se estudian mediante procesos similares a los que se emplean para identificar las propiedades biológicas de los fármacos usados en animales y humanos sin sustituir la dieta (Biurete *et al.*, 2009).

Los productos nutraceuticos son auxiliares en el cuidado y mantenimiento de la salud, así como en la prevención de enfermedades y en la mejora de las funciones fisiológicas del organismo (Pérez 2006; Mata *et al.*, 2016).

Existen varios estudios referentes a las propiedades que presentan muchas plantas usadas para tratar enfermedades evidenciando una mejora o el restablecimiento de la salud. Un ejemplo de estas plantas es el orégano mexicano (*Lippia graveolens*), distribuido por México, Centro y Sur América, el cual es ampliamente usado por sus propiedades culinarias y terapéuticas, como antiinflamatorio, antimicrobiano, analgésico, digestivo, antiséptico, hipoglucemiante, hipocolesterolémico, entre otros (Asensio *et al.*, 2013; Pérez *et al.*, 2014, Téllez *et al.*, 2017).

Aunque la utilización de la planta de orégano prácticamente incluye la hoja, también pueden ser aprovechables tallos y flores como alimento para rumiantes y disminuir las emisiones de metano (Gallegos *et al.*, 2019). Sin embargo, en la gran mayoría de los casos solo se utiliza una parte de la planta medicinal, originando residuos con un elevado impacto ambiental.

En nuestro país, los desechos o subproductos agrícolas (cáscaras, huesos, bagazo, frutas y vegetales dañados o con problemas de madurez y calidad), representan un

problema ambiental, ya que no se cuenta con políticas adecuadas para su manejo y la mayoría de las veces son quemados (Sumaya *et al.*, 2012).

Hay evidencias que reportan el estudio de residuos agroindustriales buscando una actividad farmacológica, como el mango y los desechos generados durante su comercialización o su procesamiento (cáscara y huesos), los cuales son una fuente muy importante de compuestos bioactivos de alto valor agregado, en particular fibra dietaria, micronutrientes, polifenoles, carotenoides (Sumaya *et al.*, 2012). Otros ejemplos son: semillas de uva (Dang *et al.*, 2014), aguacate (Rosero *et al.*, 2019), café (Suárez 2012), epicarpio de tomate (Irala *et al.*, 2020), mandarina (Delgado 2020) hojas de olivo (Reales *et al.*, 2010), cortezas de mango (Nuevas *et al.*, 2012) o de encino (Soto 2016).

Por lo tanto, siendo las especies vegetales una fuente muy importante de nutraceuticos es posible obtenerlos de algunos subproductos agrícolas, los cuales se generan del uso primario que se le da a una planta. Uno de estos nutraceuticos son los compuestos polifenólicos de interés industrial. En el caso particular de la planta de orégano mexicano, del que se obtiene aceite esencial de las hojas y el tallo sin un valor comercial aparente, puede ser un recurso potencial para la búsqueda de nuevos productos con utilidad nutraceutica.

Siendo el caso en este trabajo se utilizaron los residuos que se generan en la Cooperativa Oro Verde del Desierto en Cuencamé Durango, dedicada al acopio y distribución de orégano mexicano (*Lippia graveolens*), así como a la extracción de aceite esencial. Estos residuos corresponden a hojas obtenidas después de la extracción del aceite (bagazo) y tallos.

## 2. ANTECEDENTES

### 2.1 Principal función de un alimento

La principal función de la alimentación es aportar los nutrientes necesarios para satisfacer las necesidades metabólicas y funcionales de las personas. A través de los macronutrientes (carbohidratos, lípidos y proteínas), micronutrientes (vitaminas y minerales esenciales) y del agua que, consumidos en forma equilibrada de acuerdo a los requerimientos de cada edad y sexo, se obtiene todo lo necesario para “vivir bien” desde el punto de vista nutricional (Valenzuela *et al.*, 2014).

En la actualidad existe una “transición epidemiológica”, ya que las causas de enfermedad y de mortalidad comienzan a ser diferentes de aquellas que aquejaban a la población hace treinta o cincuenta años. Las patologías infecciosas, particularmente las gastrointestinales, las enfermedades neonatales y la desnutrición, entre otras, están en franco retroceso para dar paso a un aumento creciente de las enfermedades del aparato circulatorio, neoplasias, diabetes y obesidad, llamada “enfermedad de la opulencia”, identificadas genéricamente como enfermedades crónicas no transmisibles. (Álvarez *et al.*, 2011; Valenzuela *et al.*, 2014).

### 2.2 Nuevos alimentos

La alimentación en sus aspectos conceptuales ha sufrido importantes modificaciones a lo largo de los últimos años. La necesidad de atender a nuevas exigencias sociales y de salud ha motivado la aparición de los alimentos funcionales y nutracéuticos que, además de sus funciones nutritivas generales, presentan determinadas propiedades para el mantenimiento de la salud. Así, los alimentos funcionales y nutracéuticos, consumidos como parte de una dieta equilibrada y acompañados de un estilo de vida saludable ofrecen la posibilidad de mejorar la salud y/o prevenir ciertas enfermedades. (Ferreira *et al.*, 2007; Rojas *et al.*, 2015; Jaramillo & Valdivia 2016).

El ritmo acelerado de vida actual tiene como consecuencia la falta de tiempo para cocinar. Por otro lado, en los países desarrollados se asiste a una enorme oferta

alimentaria que dificulta la toma de decisiones adecuadas y conduce a que muchas personas e incluso colectividades no sigan una alimentación equilibrada y, por tanto, no ingieran los nutrientes que necesitan o en las cantidades adecuadas. (Rojas *et al.*, 2015).

Ya existe en el mercado una gran variedad de alimentos a disposición del consumidor, pero en estos momentos la prioridad es identificar qué alimentos pueden mejorar la salud, el bienestar y reducir el riesgo o retrasar la aparición de importantes enfermedades como padecimientos cardiovasculares, diabetes mellitus, cáncer y osteoporosis. Si los alimentos se combinan con un estilo de vida sano, pueden contribuir de forma positiva a mejorar la calidad de vida (Francini *et al.*, 2019). Por lo que es un reto permanente para la comunidad científica la investigación de nuevas alternativas de prevención de las enfermedades por medio de la aplicación de los hallazgos de la dietética y biotecnología de los alimentos.

Como consecuencia de lo anterior, han surgido los alimentos funcionales que tienden a compensar los desequilibrios y desajustes alimentarios y que corrigen sustancialmente la ingesta de nutrientes por las ventajas que suponen para la salud y sus efectos psicológicos (Ferreira *et al.*, 2007).

Así, la idea de atribuir a los alimentos determinadas “virtudes” dista de ser reciente; por el contrario, el origen de este concepto se remonta a más de dos mil años; como la frase propuesta por Hipócrates, “que la alimentación sea tu única medicina y que la medicina sea tu alimentación” (Valenzuela *et al.*, 2014).

### **2.3 Alimento funcional**

Un alimento funcional puede ser un alimento natural, un alimento al que se ha añadido un componente o un alimento al que se le ha quitado un ingrediente mediante medios tecnológicos o biológicos. Son, por lo tanto, alimentos naturales o procesados los cuales aparte de su contenido nutritivo, contienen ingredientes que desempeñan una actividad específica en las funciones fisiológicas del organismo humano. Así, “un

alimento se puede considerar funcional si se demuestra que, además de tener un efecto nutricional adecuado, modifica de forma beneficiosa una o varias funciones del organismo de modo que contribuye a mejorar la salud y el bienestar o a reducir el riesgo de padecer enfermedades” (Ferreira *et al.*, 2014; Rojas *et al.*, 2015).

## **2.4 Nutracéutico**

La introducción formal del término “nutracéutico” fue planteada por el Doctor Stephen DeFelice en 1989, y consta simplemente de la fusión de dos elementos básicos: un componente nutricional y otro farmacéutico. DeFelice resumió el término como: “un alimento (o parte del mismo) que proporciona beneficios a la salud, mediante la prevención y/o tratamiento de una enfermedad y que pueden ser desde nutrientes aislados, suplementos dietarios, hasta productos elaborados genéticamente” (Rojas *et al.*, 2015)

### **2.4.1 Clasificación de los nutracéuticos**

Estos productos pueden catalogarse según su mecanismo de acción, su naturaleza química y su origen (Ferreira *et al.*, 2007).

**Mecanismo de acción.** - Los separa en subgrupos según las funciones metabólicas y fisiológicas sobre las que actúan. Entre ellos se pueden reconocer: los agentes antioxidantes, reguladores del metabolismo lipídico, antiinflamatorios e inmunorreguladores, osteogénicos y que tienen actividad anticancerígena.

**Naturaleza química.** - Son clasificados como: fuentes proteicas, carbohidratos, lípidos, además de micronutrientes como metales y microorganismos (probióticos).

**Su origen.** - Se pueden señalar dos tipos de nutracéuticos; primer grupo, de origen animal y vegetal, segundo grupo, los de origen mineral.

### **2.4.2 Diferencia entre alimento funcional, nutracéutico y medicamento**

Alimento funcional es todo aquel alimento semejante en apariencia física al alimento convencional al que se le ha agregado uno o varios componentes (vitaminas, minerales, proteínas) o quitado algunos (grasas) mediante medios tecnológicos o biológicos que, al ser consumido como parte de la dieta diaria, es capaz de producir demostrados efectos metabólicos o fisiológicos útiles en el mantenimiento de una buena salud física y mental y en la reducción del riesgo de enfermedades crónico-degenerativas, además de sus funciones nutricionales básicas.

Un compuesto nutracéutico se puede definir como un suplemento dietético, presentado en una matriz no alimenticia (píldoras, cápsulas, polvo, etc.), de una sustancia natural bioactiva concentrada, presente usualmente en los alimentos y que, tomada en dosis superior a la existente en esos alimentos, presumiblemente tiene un efecto favorable sobre la salud mayor al que podría tener el alimento normal.

Un medicamento es el resultado de una investigación farmacológica y generalmente un producto de síntesis natural, semi sintética o sintética que puede curar, prevenir o diagnosticar una enfermedad (NOM 059 SSA 2016). En contraste, los alimentos funcionales y los nutracéuticos no pretenden curar nada, sino preservar la salud y prevenir enfermedades al complementar una alimentación saludable (Pérez 2006).

### **2.4.3 Demanda de alimentos funcionales y nutracéuticos**

Para elaborar un alimento funcional o nutracéutico, se requieren diversos estudios analíticos, químicos y fisicoquímicos, además de análisis *in vitro*, *in vivo*, microbiológicos, toxicológicos, reológicos, sensoriales que garanticen su inocuidad y seguridad. Gracias a esto, diferentes investigadores han centrado su interés en el efecto que tiene la nutrición a nivel fisiológico y la relación entre la alimentación y las enfermedades crónicas no transmisibles, con el fin de contribuir a la salud y bienestar de la población (Rojas *et al.*, 2015; Viada *et al.*, 2017).



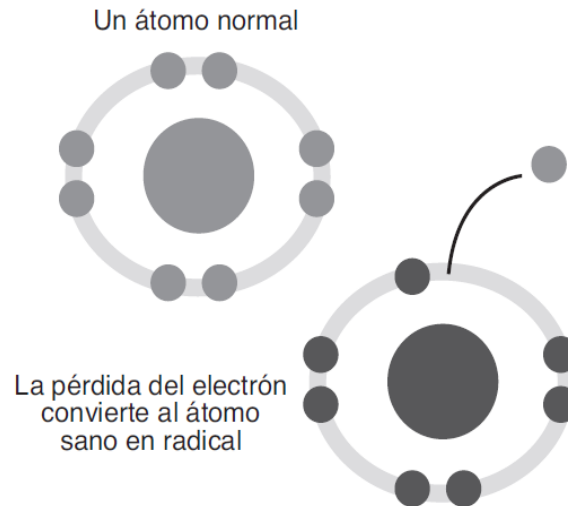
Así, la frecuente presencia de efectos adversos asociados a las terapias farmacológicas y en algunos casos, a la falta de respuesta terapéutica, impulsó nuevas investigaciones para determinar alternativas para la prevención y el tratamiento de enfermedades crónicas no transmisibles. Al respecto, se determinó que la nutrición juega un papel crucial en su fisiopatología y que identificar o elaborar alimentos que influyan en este proceso puede ser una alternativa para lograr disminuir la prevalencia de estas enfermedades (Ortega *et al.*, 2018).

Actualmente en el mercado se encuentra una amplia variedad de productos nutracéuticos. En países como Estados Unidos, el consumo ha llegado a ser hasta del 47% en los hombres y del 50% en las mujeres, quienes consumen diariamente vitaminas, probióticos y compuestos herbales (Rojas *et al.*, 2015).

Es evidente que el impacto de la exitosa recepción en el mercado de los nutracéuticos y productos relacionados tendrá un papel crucial en el crecimiento del sector alimenticio, farmacéutico y agrícola, permitiendo el desarrollo económico e industrial debido a su amplia comercialización (Rojas *et al.*, 2015).

## 2.5 Antioxidantes

Un antioxidante es una molécula que se ha correlacionado positivamente con la capacidad de ciertas plantas para eliminar radicales libres e inhibir enzimas prooxidantes (Fig1), (Valencia *et al.*, 2017).



**Figura 1.-** Formación de un radical libre por la pérdida de un electrón (Jaramillo &Valdivia 2016).

En la actualidad existen múltiples reportes que demuestran la capacidad antioxidante de compuestos distribuidos en toda la planta en mayor o menor proporción, por ejemplo: fruto de pitaya (Aguirre *et al.*, 2012), hojas de orégano mexicano (Cortés *et al.*, 2021), flores de *Cordia lutea* (Venegas *et al.*, 2019), corteza de pino (Pacheco *et al.*, 2020), semillas de chía (Ortega *et al.*, 2016), etc. que se han utilizado en tratamientos médicos tradicionales desde hace mucho tiempo, en diversas partes del mundo (Asensio 2013; Ortega 2018).

La acción antioxidante presente en las plantas puede ayudar a combatir enfermedades provocadas por la reacción de los radicales libres o especies reactivas del oxígeno, nitrógeno o hierro, con macromoléculas como ARN, ADN y proteínas. Los radicales libres son moléculas con un electrón desapareado, capaces de favorecer reacciones en cadena muy dañinas para el organismo (cuadro 1), que desencadenan un

fenómeno conocido como estrés oxidativo (Viada *et al.*, 2017). Los principales grupos de radicales libres son:

**EROS** (Especies de Oxígeno Reactivas) los cuales comprenden: el radical anión superóxido ( $O_2^{\bullet-}$ ), hidroxilo ( $OH^{\bullet}$ ), hidroperoxilo ( $HO_2^{\bullet}$ ), peroxilo ( $RO_2^{\bullet}$ ), peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ), alcoxilo ( $RO^{\bullet}$ ), oxígeno singlete ( $^1O_2$ ), y Ozono ( $O_3$ ).

**ERNS** (Especies de Nitrógeno Reactivas). Óxido nítrico ( $NO^{\bullet}$ ), peróxido de nitrógeno ( $ONOO^{\bullet}$ ), Dióxido de nitrógeno ( $NO_2^{\bullet}$ ), (Galina *et al.*, 2018)

**Cuadro 1.-** Estructuras celulares alteradas por EROS (Jaramillo & Valdivia 2016).

Compuesto	Alteración
<b>Lípidos</b>	Oxidación de los ácidos grasos poliinsaturados de las membranas y orgánulos de las células.
<b>Proteínas</b>	Inactivación de enzimas por oxidación de los grupos sulfhidrilo. Lo mismo ocurre en las proteínas estructurales.
<b>Carbohidratos</b>	Despolimerización de polisacáridos
<b>Ácidos nucleicos</b>	Hidroxiación de bases, entrecruzamientos y rotura de las bandas del ADN, lo que causa mutaciones e inhibición de la síntesis de proteínas.

Así, la relación del daño originado por el exceso de radicales libres a diferentes moléculas ha sido recientemente asociado a enfermedades tales como: Alzheimer, cáncer y algunas enfermedades cardiovasculares, debido a mecanismos de peroxidación lipídica, daño al DNA y proteínas, entre otros (Butera *et al.*, 2002; Nuengchamnong *et al.*, 2004; Mata *et al.*, 2016).

El cuerpo tiene varios mecanismos de defensa para neutralizar el estrés oxidativo mediante el uso de agentes antioxidantes. Los antioxidantes se pueden producir en

las células (antioxidante endógeno) y/o suministrados externamente a través de los alimentos y suplementos (antioxidantes exógenos).

Los sistemas de defensa frente a los radicales libres se pueden clasificar según su mecanismo de acción o según su naturaleza.

**SEGÚN EL MECANISMO DE ACCIÓN:** se dividen en: primarios, secundarios y terciarios.

**Antioxidantes primarios:** Previenen la formación de nuevos radicales libres. Esto lo consiguen convirtiendo los radicales libres existentes en moléculas menos perjudiciales antes de que puedan reaccionar o evitando la formación de radicales libres a partir de otras moléculas.

**Antioxidantes secundarios:** Capturan los radicales evitando las reacciones en cadena. La mayoría de estos compuestos son diarilaminas y fenoles capaces de aceptar el electrón desapareado del radical libre y de estabilizarlo en su estructura, evitando así la propagación de la cadena radicalaria.

**Antioxidantes terciarios:** Reparar las biomoléculas dañadas por los radicales libres. Incluyen enzimas reparadoras de ADN, metionina y sulfóxido reductasa. La actividad antioxidante de dichos compuestos se debe a que presentan una gran actividad biológica, tales como polifenoles, vitaminas y minerales.

**SEGÚN LA NATURALEZA:** Se clasifican en enzimáticos y no enzimáticos (cuadro 2), (Amaya 2013; Santa & Camargo 2016; Johar & Bernstein 2017).

**Cuadro 2.-** Clasificación de los antioxidantes según su naturaleza (Amaya 2013).

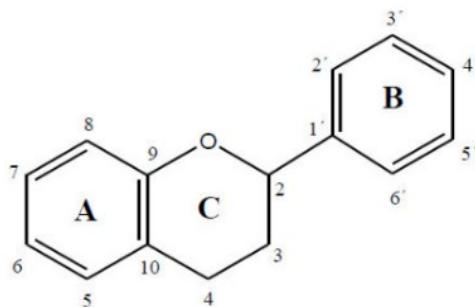
<b>Antioxidantes</b>	<b>Propiedades</b>
<b>ENZIMÁTICOS</b>	
<b>Superóxido Dismutasa (SOD)</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>✓ Elimina los radicales superóxidos</li> <li>✓ Primera línea de defensa</li> </ul>
<b>Glutación peroxidasa</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>✓ Remueve H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> e hidroperóxidos orgánicos.</li> <li>✓ Cada una de las subunidades contiene un átomo que es esencial para su actividad.</li> </ul>
<b>Catalasa</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>✓ Cataliza la descomposición del H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> para formar agua y oxígeno.</li> <li>✓ Junto con la peroxidasa actúa como protector de la hemoglobina.</li> </ul>
<b>NO ENZIMÁTICOS</b>	
<b>Vitamina C (ácido ascórbico)</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>✓ Neutraliza directamente al ion superóxido, radical oxidrilo, oxígeno singlete.</li> <li>✓ Regenera la forma oxidada de la vitamina E</li> </ul>
<b>Glutación</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>✓ Principal defensa a nivel intracelular frente a las agresiones oxidantes.</li> <li>✓ Interviene en la síntesis de ADN</li> <li>✓ Participa en la detoxificación de xenobióticos</li> <li>✓ Actúa como protector frente a la radiación y estrés oxidativo</li> </ul>
<b>Vitamina E</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>✓ Neutraliza el radical superóxido</li> <li>✓ Protege las membranas biológicas</li> <li>✓ Inhibe la fase de propagación de la cadena de la lipoperoxidación</li> </ul>
<b>Carotenoides Flavonoides (polifenoles)</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>✓ β- caroteno posee actividad antioxidante</li> <li>✓ Se ha descrito como el más importante neutralizador del oxígeno singlete aislado de la naturaleza.</li> <li>✓ Quelar iones,</li> <li>✓ Transferencia de electrones o protones a radicales libres</li> </ul>
<b>Iones metálicos (transferrina).</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>✓ Quelar iones de metales responsables de la reacción de Fenton</li> </ul>

### 2.5.1 Polifenoles

Los compuestos fenólicos son metabolitos esenciales para el crecimiento y reproducción de las plantas y actúan como agentes protectores frente a patógenos, siendo secretados como mecanismos de defensa en condiciones de estrés tales como infecciones, radiaciones UV o depredadores (Muñoz *et al.*, 2007; Francini *et al.*, 2019).

La actividad antioxidante de los compuestos fenólicos depende de las propiedades REDOX de sus grupos hidroxifenólicos y de la relación estructural entre las diferentes partes de la estructura química. Los grupos hidroxilo fenólicos tienen excelentes propiedades de quelación del hierro y otros metales de transición. Es por eso que desempeñan un papel muy importante en la protección frente a los fenómenos oxidativos y tienen efectos terapéuticos en un elevado número de patologías, incluyendo la cardiopatía isquémica, la aterosclerosis o el cáncer (Ortiz 2011; Jaramillo & Valdivia 2016).

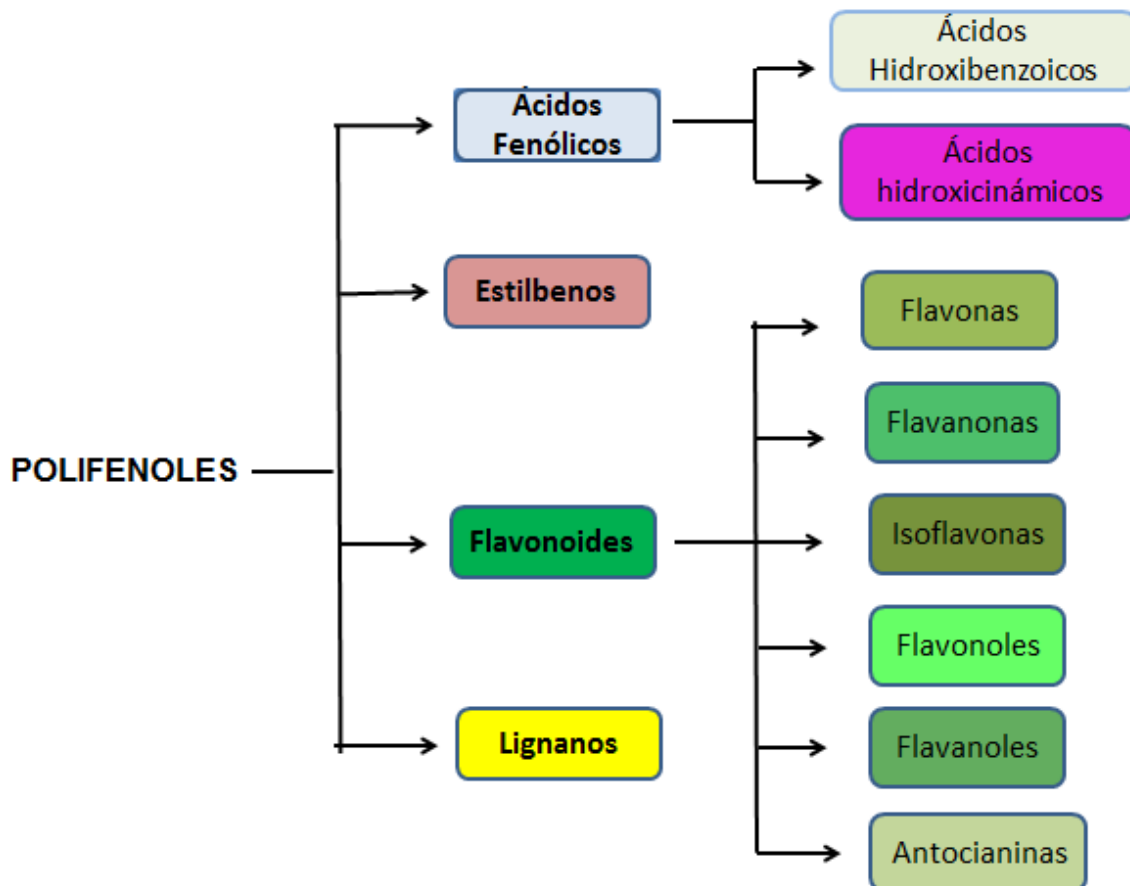
La acción antioxidante de los flavonoides radica esencialmente en el enlace doble C-2 C-3, el carbonilo C-4 y los hidroxilos en C-3 y C-5 (Fig. 2), (Valencia *et al.*, 2017). Otros criterios químicos considerados para que los flavonoides tengan propiedades antioxidantes son los siguientes: presencia de estructura O-dihidroxi en el anillo B, que confiere una mayor estabilidad a la forma radical y participa en la deslocalización de los electrones. Grupos 3- y 5-OH con función 4-oxo en los anillos A y C necesarios para ejercer el máximo potencial antioxidante (Martínez *et al.*, 2002).



**Figura 2.-** Estructura básica de los flavonoides (Martínez *et al.*, 2002).

Los flavonoides retiran el oxígeno reactivo, especialmente en forma de aniones superóxidos, radicales hidroxilos, peróxidos lipídicos o hidroperóxidos; de esta manera bloquean la acción de dichas sustancias en las células. Diversos flavonoides han mostrado su eficiencia para eliminar los procesos de peroxidación lipídica del ácido linoleico o de los fosfolípidos de las membranas.

Entre los polifenoles Fig. 3, mayormente encontrados en los materiales vegetales estudiados se encuentran: flavonoides, isoflavonas, flavonas, catequinas, isocatequinas y colorantes como betaínas (Arcila *et al.*, 2004).



**Figura 3.-** Clasificación de los polifenoles en función del número de anillos de fenol que contienen (Conlon *et al.*, 2014).

## 2.6 Síndrome Metabólico

El síndrome metabólico (SM) se define como el conjunto de alteraciones metabólicas constituido por la obesidad de distribución central, la disminución de las concentraciones del colesterol unido a las lipoproteínas de alta densidad (cHDL), la elevación de las concentraciones de triglicéridos, el aumento de la presión arterial (PA), resistencia a la insulina (RI) y la hiperglicemia (De *et al.*, 2019; Robberecht *et al.*, 2018). Además, el SM incluye microalbuminuria e inflamación crónica de bajo grado (Zimmet *et al.*, 2005; Orellana *et al.*, 2010; Fernández 2016; Palomino *et al.*, 2017; Caisedo & Vivero 2017).

El SM se está convirtiendo en uno de los principales problemas de salud pública del siglo XXI en todo el mundo (Casarrubios 2018; Yanes *et al.*, 2021), el cual se ha asociado con un riesgo 5 veces mayor de diabetes tipo II y 2-3 veces mayor riesgo de enfermedad cardiovascular (ECV) (Zimmet *et al.*, 2005; Álvarez *et al.*, 2011).

El SM es una compleja combinación de problemas de salud que pueden aparecer de forma simultánea en un individuo y que dependen de factores genéticos y ambientales (asociados al estilo de vida), en el que la resistencia a la insulina se considera el componente fundamental de este padecimiento (Orellana *et al.*, 2010, Condorhuamán *et al.*, 2019).

De acuerdo a las definiciones del Panel de Tratamiento para el Adulto III (ATP-III), la Organización Mundial de la Salud (OMS), la Federación Internacional de la Diabetes (IDF) y la European Group for the study of Insulin Resistance (EGIR), el parámetro más constante como criterio diagnóstico es la obesidad, evaluada por el Índice de Masa Corporal ( $IMC \geq 30 \text{ kg/m}^2$ ) y el perímetro de cintura: mujeres  $> 88 \text{ cm}$ ; hombres  $> 90 \text{ cm}$  (Cuadro 3), (Morales 2010, Álvarez *et al.*, 2011; Caisedo & Vivero 2017).



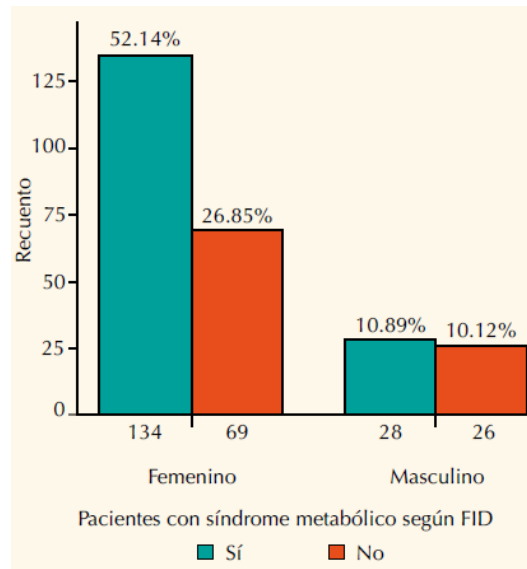
**Cuadro 3:** Criterios de diagnóstico para el SM y su tratamiento (Morales 2010).

PARÁMETROS	IDF 2005	ATP-III 2004	ADA 2006	TRATAMIENTO
Índice de cintura (cm)	≥ 94/80 (V/M)	≥ 102/88 (V/M)	-----	Sibutramina Orlistat
HTA (mmHg)	> 130/85	> 130/85	> 130/85	Diuréticos IECA ARA-II α-bloqueantes β-bloqueantes
Colesterol (mg/dl) cHDL (mg/dl) LDL (mg/dl) Triglicéridos (mg/dl)	> 185 > 50/40 M/H > 150	>185 > 50/40 M/H > 150	> 185 > 50/40 M/H > 150	Estatinas Fibratos Ácido nicotínico Ezetimiba Resinas
Glucemia basal (mg/dl) HbA (%)	> 100 > 6.5	> 110	> 100 > 7 (6.5)	Metformina Acarbosa Glitazonas
Estado protrombótico	-----			AAS Clopidrogel

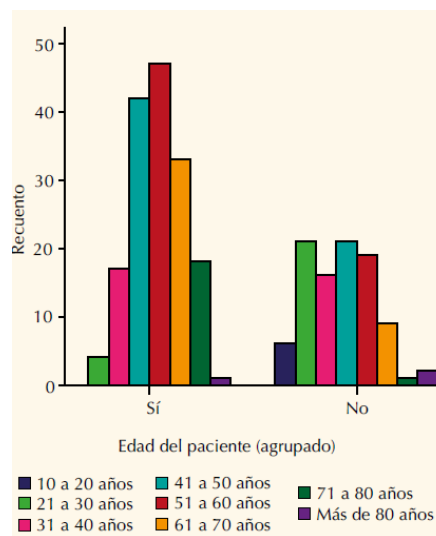
HTA Hipertención arterial, HbA Hemoglobina glucosilada, M/H Mujeres/ Hombres.

El SM es una de las patologías con mayor prevalencia en la sociedad mexicana. El factor con mayor incidencia es la obesidad y sobrepeso, pues se trata de una población sedentaria y con deficientes hábitos alimenticios. La prevalencia del SM varía según edad, género, origen étnico y estilo de vida (Palomo *et al.*, 2009).

En México la población presenta deficientes hábitos alimenticios en cuanto a calidad y cantidad que resultan en dislipidemia y predisposición genética de enfermedades crónico-degenerativas con subsiguiente aumento de los índices de SM. La Fig.4 muestra los resultados de un estudio del hospital Regional Militar de la Cd. de Acapulco Gro., los cuales no distan de lo reportado en otros países (Pacheco *et al.*, 2017).



**Figura 4.-** Distribución por género de individuos con y sin SM, según la Federación Internacional de Diabetes (FID) (Pacheco *et al.*, 2017).



**Figura 5.-** Distribución etaria con SM (FID), (Pacheco *et al.*, 2017).

El SM desencadena la propagación de otras enfermedades, por ejemplo: diabetes tipo 2, enfermedades coronarias, accidente cerebrovascular y otras discapacidades.

A pesar de las modificaciones en el estilo de vida (cambios en la dieta, aumento de la actividad física, etc.), muchos de los pacientes con SM requieren tratamiento farmacológico como se mostró en el cuadro 3, son varias opciones, pero con riesgo de efectos secundarios.

Así, la medicina herbaria y productos nutracéuticos desarrollados a partir de drogas vegetales con sus combinaciones de metabolitos secundarios con actividad farmacológica, se utilizan en el tratamiento de varias dolencias basada en evidencias y que sirven como coadyuvantes en la medicina alópata (De *et al.*, 2019).

### 2.6.1 Obesidad

La obesidad es una enfermedad crónica, caracterizada por un aumento patológico de grasa corporal que se asocia a un mayor riesgo para la salud, originando una serie de alteraciones (Cuadro 4), (García *et al.*, 2008) se produce por un balance calórico positivo, ya sea por elevado aporte calórico, reducción del gasto energético o una combinación de ambos (Real *et al.*, 2020).

**Cuadro 4.-** Alteraciones ocasionadas por la obesidad (García *et al.*, 2008).

<b>ALTERACIÓN</b>	<b>PATOLOGÍA</b>
<b>Alteraciones de la glucosa</b>	Ocasiona Diabetes Mellitus Tipo II
<b>Alteraciones de los lípidos</b>	Aumento de los triglicéridos y colesterol produce dislipidemias
<b>Trastornos cardiovasculares</b>	Hipertrofia ventricular izquierda
<b>Problemas respiratorios</b>	Menor oxigenación, apneas nocturnas,
<b>Depósito de grasa en el hígado</b>	Esteatosis hepática, cirrosis hepática
<b>Alteraciones ortopédicas</b>	Sobrecarga de las articulaciones, columna, cadera, rodillas
<b>Enfermedades de la piel</b>	Irritación de los pliegues cutáneos de axilas e ingle, susceptibilidad a infecciones por hongos

Actualmente se considera a la obesidad la epidemia del siglo XXI, (Rabadán *et al.*, 2015; Morais *et al.*, 2018) que afecta a hombres y mujeres de todas las edades, con mayor prevalencia en mujeres y en el estrato socioeconómico bajo (Baudrand *et al.*, 2010; Álvarez *et al.*, 2011).

En 2018 La Encuesta Nacional de Salud y Nutrición (ENSANUT) reportó que en México había 18 millones de personas con obesidad y que el grupo de edad que presentó la prevalencia más alta fue el grupo de 30 a 59 años: 35% de los hombres y 46% de las mujeres.

### 2.6.1.1 Clasificación de la obesidad

Según la distribución topográfica de la grasa se reconocen diferentes fenotipos:

- **Obesidad generalizada:** La distribución de la grasa no se localiza en ninguna zona corporal en especial.
- **Obesidad androide:** La distribución de la grasa se encuentra preferentemente en la mitad proximal del tronco. Es la que se relaciona con mayor frecuencia a complicaciones cardiovasculares y metabólicas.
- **Obesidad ginecoide:** La distribución de la grasa es preferentemente pélvica. Es la que se relaciona con mayor frecuencia con patología vascular periférica (Varices) y litiasis biliar. Es más frecuente en mujeres y responde con mayor agresividad a las medidas terapéuticas que la obesidad androide (Aragonés *et al.*, 2018).
- **Obesidad visceral o intra- abdominal.** La grasa visceral está contenida en la parte interna de las cavidades corporales envolviendo órganos, sobre todo abdominales y está compuesta por la grasa mesentérica y la grasa de los epiplones. Los depósitos de grasa visceral representan cerca del 20% del total de grasa corporal en el hombre y aproximadamente el 6% en la mujer (Godínez *et al.*, 2002).

Desde el punto de vista clínico, se divide en dos grandes grupos:

- **Obesidad endógena:** También llamada intrínseca o secundaria. Constituye en la infancia alrededor del 1% de los casos de obesidad. Las causas más habituales son: Enfermedades endocrinas, neurológicas, síndromes genéticos y la ingesta crónica de fármacos.
- **Obesidad exógena o simple:** Constituye el 99% de los casos, la relación entre el gasto energético y la ingesta están alteradas, (Aragonés *et al.*, 2018).

La obesidad especialmente la de tipo central o androide, se asocia con una mayor prevalencia de patologías crónicas, tales como hipertensión arterial (HTA), diabetes mellitus Tipo II (DM2) e Insulino resistencia (IR), (Méndez *et al.*, 2018) colelitiasis, hígado graso no alcohólico (HGNA), dislipidemia, cardiopatía coronaria, cáncer, enfermedades respiratorias, psiquiátricas y osteoarticulares. Dichos padecimientos limitan las expectativas y calidad de vida, representando un serio problema para la salud pública mundial (Baudrand *et al.*, 2010; Fernández 2016).

La mayoría de los casos de obesidad son de origen multifactorial, reconociéndose factores genéticos, metabólicos, endocrinológicos y ambientales. (Mora *et al.*, 2019), Sólo del 2-3% de los casos de obesidad son por alguna patología endocrinológica, entre las que destacan el hipotiroidismo (que produce un leve aumento de peso), síndrome de Cushing, hipogonadismo y lesiones hipotalámicas asociadas a hiperfagia (Baudramd *et al.*, 2010; Mendoza *et al.*, 2015).

En los últimos años distintos estudios han sugerido que la obesidad podría ser un desorden inflamatorio (Rodríguez *et al.*, 2009 Suárez *et al.*, 2017) Asimismo, el estrés oxidativo se ha propuesto como un potencial inductor de la inflamación y de la susceptibilidad a la obesidad y patología asociadas (Bello *et al.*, 2019)

Entre los biomarcadores relacionados con la obesidad, se encuentran: resistencia a la insulina, factor de necrosis tumoral alfa (TNF- $\alpha$ ), interleucinas 6 y 18, angiotensinógeno, factor de crecimiento TGF- $\beta$ , inhibidor de la activación del plasminógeno, leptina, resistina, proteína C reactiva, amiloide A, ácido siálico, marcadores de disfunción endotelial (factor Von Willebrand, ICAMs, vCAMs) factor 3 del sistema del complemento, haptoglobina, glicoproteína zinc-alfa 2, eotaxina, visfatina, alfa1-antitripsina, omentina, proteína transportadora de retinol 4, ceruloplasmina, adiponectina y desnutrina (Zulet *et al.*, 2007.)

El tejido adiposo (TA) se encuentra ampliamente vascularizado y su potencial de crecimiento es ilimitado, presenta una alta heterogeneidad de acuerdo a su localización corporal, ya que puede ser subcutáneo, (debajo de la piel) y comprende alrededor del 80% de la grasa corporal total, o visceral (rodea las vísceras) y representa el 10% del total de grasa (Ortiz 2011).

En los mamíferos existen dos tipos de TA, el tejido adiposo marrón (TAM), que regula principalmente la termogénesis corporal, y el tejido adiposo blanco (TAB), que representa el principal almacén de energía del organismo en forma de triglicéridos. El proceso de almacenamiento e hidrólisis de TA está altamente regulado hormonalmente por la insulina y las catecolaminas; metabólicamente por la glucosa y los ácidos grasos no esterificados y nutricionalmente a través de la ingesta energética de lípidos y carbohidratos (Ortiz 2011; Bello 2018).

La función principal del TAB, además del almacenamiento de grasa es la secreción de aproximadamente 50 moléculas bioactivas conocidas como adipocinas, llamadas así por su similitud con las citocinas del sistema inmunitario (Bello *et al.*, 2018). Entre las adipocinas derivadas del TAB se encuentra el TNF- $\alpha$ , leptina, adiponectina y resistina.

A diferencia de otras glándulas endócrinas la masa del TAB es variable y puede aumentar o disminuir progresivamente de tamaño dependiendo de la edad, ingesta

alimentaria, actividad física, programación perinatal y predisposición genética (Bello *et al.*, 2018).

### 2.6.2 Leptina

La leptina producto del gen *lep* toma su nombre del griego *Leptos* (delgado), es una hormona compuesta por 167 aminoácidos (Pérez 2007), con un peso molecular de 17 kDa que pertenece a la familia de las citocinas clase 1 o de receptores de factores de crecimiento hematopoyéticos (Ortíz 2011).

La leptina es secretada por un gran número de células como las neuronas, células de la placenta, monocitos, macrófagos, linfocitos TH1, estómago, epitelio mamario y los adipocitos. El tejido adiposo subcutáneo contribuye con un 80% en la síntesis de leptina (Antuna *et al.*, 2008; Vega 2010). La concentración de esta molécula se correlaciona de manera positiva con la cantidad de tejido adiposo (Ortiz 2011).

El principal sitio de acción de la leptina es en el hipotálamo (Muñoz *et al.*, 2004) en el núcleo arcuato, el cual comprende dos poblaciones de neuronas: la primera libera el neuropéptido Y que representa la vía orexigénica (inductora del apetito); así la leptina disminuye la producción de neuropéptido Y. El neuropéptido Y, se produce en el núcleo arcuato y es liberado por el núcleo paraventricular del hipotálamo se encuentra ampliamente distribuido en el cerebro y al unirse a sus receptores Y1 y Y5 aumenta la ingesta de alimentos y estimula la secreción de insulina por vía parasimpática, concomitantemente el neuropéptido Y aumenta la actividad del eje hipotálamo-hipófisis-suprarrenal que resulta de un aumento de cortisol. Las consecuencias metabólicas de estos cambios hormonales son un incremento del tejido adiposo y de la actividad lipogénica del hígado debido a la hiperinsulinemia además de disminución de la utilización de glucosa por el músculo debida a resistencia a la acción de la insulina (Morales *et al.*, 2010).

La segunda población de neuronas secreta proopiomelanocortina y representa la vía anorexigénica (inductora de saciedad), de la hormona concentradora de melanina, la

hormona liberadora de corticotropina, el sistema de melanocortina con la propia melanocortina. A través de esto la leptina ejerce su efecto disminuyendo la ingesta y por lo tanto el peso corporal, aumentando la oxidación de grasa y el gasto energético favoreciendo así el adelgazamiento.

Debido a estos atributos, la leptina es considerada como una hormona anti-obesidad. Recientemente se han demostrado sus efectos pleiotrópicos sobre la función reproductora, la hematopoyesis, la angiogénesis, la homeostasis de los órganos linfoides y funciones de los linfocitos T (Muñoz *et al.*, 2007), con lo cual se puede afirmar que la leptina es un nexo entre el sistema neuroendocrino e inmune.

La expresión y la secreción de esta hormona es estimulada por insulina, glucocorticoides, TNF- $\alpha$  y estrógenos, mientras que la actividad  $\beta$ -3 adrenérgica es estimulada por andrógenos, ácidos grasos libres, hormona de crecimiento y agonistas PPAR-  $\gamma$  (Ortiz 2011).

La leptina es capaz de controlar la producción de TNF- $\alpha$  y la activación de macrófagos, promueve la agregación de plaquetas, lo cual conduce a la formación de la capa aterosclerótica y a la síntesis de especies reactivas de oxígeno, mejora la resistencia a la insulina (Ortiz 2011).

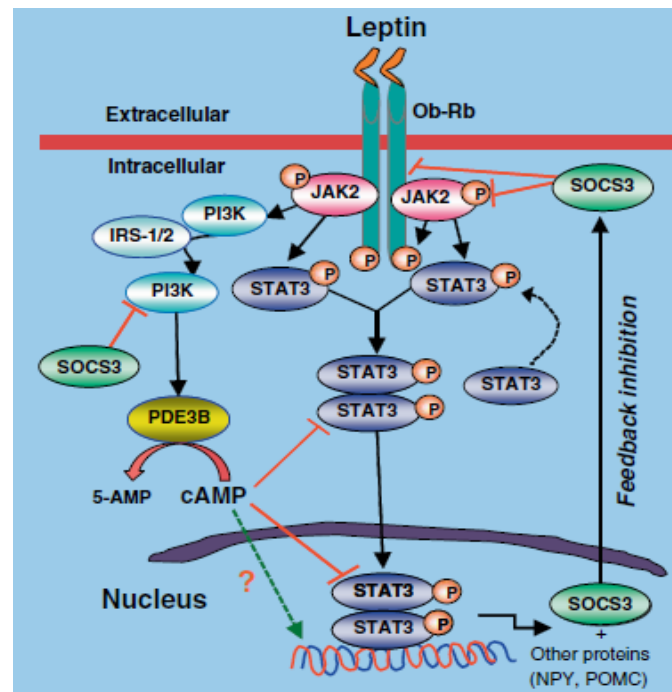
La deficiencia de leptina viene acompañada de obesidad, hiperfagia, hipogonadismo, hiperinsulinemia y disminución de la inmunidad celular (Vega-Robledo, 2010). Metabólicamente la leptina inhibe la lipogénesis y estimula la lipólisis mediante la reducción de los niveles de lípidos intracelulares en el musculo esquelético, el hígado y las células  $\beta$ -pancreáticas mejorando significativamente la sensibilidad a la insulina (Pérez 2006).

En individuos obesos se ha descrito que presentan concentraciones altas de leptina, lo cual sugiere la existencia de otra alteración que se conoce como resistencia a la leptina.



Este fenómeno se podría explicar por:

- 1.- La obstrucción de la entrada de la leptina en la barrera hematoencefálica por agonistas  $\alpha$  adrenérgicos, epinefrina, insulina, glucosa y triglicéridos.
- 2.- Extinción de la cascada de señalización intracelular de las isoformas largas de los receptores de leptina en el hipotálamo (Fig.6), (Chimal 2018; Martínez *et al.*, 2016).



**Figura 6.-** Señalización intracelular de la leptina a través de la vía JAK2/ STAT3 y PI3K-PDE3B-cAMP (Sahu 2011).

Los receptores de la leptina son receptores de citoquina clase I, se expresan en el sistema nervioso central y periférico, identificándose variantes de ellos, aunque al parecer es su forma primaria la que media la mayoría de sus efectos. Las isoformas ObRa y ObRc son receptores cortos que se localizan predominantemente en la barrera hematoencefálica, donde parecen desempeñar un papel transportador, sobre todo el ObRa. La forma ObRb, estructuralmente más larga, contiene un dominio de

señalización intracelular para la vía JAK/STAT, abunda en el hipotálamo y se asume como el principal impulsor de las acciones de esta hormona. Por último, la isoforma ObRe es la fracción soluble, la cual transporta la leptina por el torrente circulatorio, regulando su depuración y su vida media. (García et al., 2011), pero también en tejidos periféricos como el páncreas y el tracto gastrointestinal (Palou et al., 2004). La leptina y sus receptores presentan similitud estructural y funcional con la citocina IL-6 (Zulet et al., 2007).

Investigaciones realizadas en los últimos años demuestran que sólo del 5-10 % de los pacientes pueden mantener un peso adecuado después de suspender un estilo de vida saludable o de farmacoterapia (Pereyra et al., 2016), lo cual sugiere que es necesario desarrollar otras modalidades de tratamiento que produzcan mejores resultados y más sostenibles.

Los suplementos producidos a partir de extractos de plantas y terapias a base de dietas, son algunas de las estrategias más comunes para bajar de peso en medicina complementaria y alternativa. Un ejemplo de estas plantas lo representa el yacón, *Smallanthus sonchifolius* de origen andino, con propiedades medicinales, utilizada como prebiótico, para el control de la glicemia y del peso corporal (Mendoza et al., 2015), así como la *Pasiflora manicata*, la cual presenta una fuerte inhibición sobre  $\alpha$ -amilasa y  $\alpha$ -glucosidasa y por lo tanto contribuye a reducir niveles de glucosa en sangre (Morales 2017).

### **2.6.3 Diabetes Mellitus**

La diabetes mellitus (DM) es una enfermedad endócrina de anomalías metabólicas de los carbohidratos, proteínas y lípidos, caracterizada por una hiperglucemia crónica sostenida, debido a la acción inadecuada de la insulina, hormona que facilita el transporte de la glucosa al interior de la célula. Este fenómeno es causado por un déficit en la secreción de insulina pancreática, absoluta o relativa (Morales 2010).

La diabetes es una enfermedad considerada como una de las principales causas del deterioro agresivo de la salud de un individuo, ya que estos desórdenes están asociados con la incidencia y la progresión de enfermedades microvasculares (retinopatía diabética, pérdida de la visión y nefropatías) y macrovasculares (amputaciones y enfermedades cardiovasculares). Asimismo, se asocia con complicaciones a nivel del Sistema Nervioso Central (SNC) como la demencia, alteraciones cognitivas o depresión (Diab 2018).

Uno de los enfoques terapéuticos más importantes para disminuir la hiperglicemia postprandial es retardar la absorción de la glucosa a través de la inhibición de las enzimas que hidrolizan carbohidratos como  $\alpha$ -glucosidasa y  $\alpha$ -amilasa (Sevilla *et al.*, 2013). Este desorden metabólico afecta actualmente a más de 143 millones de personas en el mundo y según las estimaciones de la OMS en el 2030 aproximadamente 300 millones de personas cursarán con esta enfermedad (Vílchez *et al.*, 2018). México ocupa el segundo lugar a nivel mundial con casos de DM2. En el 2017 se registró una tasa de 405.12 casos de DM2 por cada 100 mil habitantes; mientras que, en el 2018 dicho indicador aumentó a 411.85. Esto de acuerdo al Anuario de Morbilidad de la Dirección General de Epidemiología.

Entre las consecuencias de esta enfermedad se puede tener invalidez física, así como complicaciones multiorgánicas que traen como consecuencia un incremento en morbilidad y mortalidad a nivel mundial (Sevilla *et al.*, 2013), independientemente de las circunstancias sociales, culturales y económicas (Vílchez *et al.*, 2018).

### **La clasificación etiológica de la diabetes mellitus es:**

**Tipo 1**, Autoinmune e idiopática, insulino-dependiente.

**Tipo 2**, No insulino-dependiente.

**Tipo 3**, Gestacional, y otros específicos o diabetes secundarias.

Desde la antigüedad los extractos de especies vegetales son utilizados por el hombre para la cura de múltiples dolencias. Hay mucha información etnobotánica acerca de la incidencia de las plantas en el control de diabetes mellitus (Delgado 2016).

Existen compuestos aislados de plantas cuya efectividad ha sido comparada con fármacos utilizados tradicionalmente contra la diabetes, los cuáles han sido más eficaces en su actividad hipoglucemiante que los fármacos además de confirmar su seguridad toxicológica. Los extractos de estas especies vegetales modifican cascadas metabólicas influyendo directa e indirectamente en los niveles de glucosa en el ser humano.

La digestión de almidón y azúcar produce glucosa que pasa a la sangre a través de las paredes del intestino y finalmente es llevada al hígado. Varias enzimas intervienen durante el proceso de digestión de los hidratos de carbono, pero la más importante es la  $\alpha$ -glucosidasa. La inhibición de  $\alpha$ -glucosidasa puede ser un tratamiento eficaz para DM (López *et al.*, 2013).

Los posibles mecanismos de acción de los antioxidantes se relacionan con la inhibición en el intestino de la digestión de los carbohidratos, impidiendo la liberación en particular de la glucosa, la cual también es liberada y modulada por el hígado. Los antioxidantes también podrían estimular la secreción de insulina en el páncreas, activar sus receptores y de alguna manera activar la recaptura de glucosa en los tejidos blanco por la hormona (Ortiz 2011).

Otros efectos pueden ser la modulación de las rutas genéticas, como hidroxilación de bases, entrecruzamientos y rotura de las bandas del ADN, lo que causa mutaciones que en su momento se transforman en células cancerosas e inhibición de la síntesis de proteínas. Un dato relevante es que la metformina que se utiliza para el tratamiento de pacientes con diabetes resulta un poderoso antioxidante que disminuye la formación de radicales libres (Coronado *et al.*, 2015).

Plantas medicinales a las que se les atribuye efectos hipoglucemiantes:

**Té verde** *Camellia sinensis*, Se trata de una planta muy usada desde la antigüedad en el tratamiento y prevención de patologías como diabetes y obesidad, presenta una actividad antioxidante debido principalmente a los compuestos polifenólicos (catecolaminas: epicatequina, epigallocatequina, galato de epicatequina y galato de epigallocatequina), los grupos hidroxilos que poseen estos flavonoides son responsables de la actividad antioxidante ya sea por captura de radicales libres o por formación de complejos con metales disminuyendo la oxidación del colesterol-LDL la teobromina, que incrementa el AMPc (efecto lipolítico y glucogenolítico), (Delgado *et al.*, 2016; Ortega *et al.*, 2018).

**Canela** *Cinnamomum spp*, Se utiliza su corteza. Tradicionalmente ha sido muy utilizada como antidiabético por su alto contenido en cinnamaldehído que parece potenciar el transporte por GLUT-4 (Delgado *et al.*, 2016).

**Arándano** *Vaccinium angustifolium*. preparaciones con hojas de arándano disminuyen los niveles de glucosa tanto en animales como en humanos. Se cree que el compuesto responsable de este efecto hipoglucemiante es la mirtilina, un antociano (glucósido de delfinidina), (Delgado *et al.*, 2016).

**Orégano mexicano** *Lippia graveolens*, extractos acuosos o hidroalcohólicos han reportado un efecto Hipoglucemiante, antiinflamatorio, antitusivo, antimicrobiano, debido a sus aceites esenciales tipo monoterpénico principalmente carvacrol y timol, así como a su contenido en polifenoles, (flavonoides: naringenina, kaempferol, quercetina, taxifolina, eriodictiol, entre otros), (Sevilla *et al.*, 2013).

#### 2.6.4 Resistencia a la Insulina (RI)

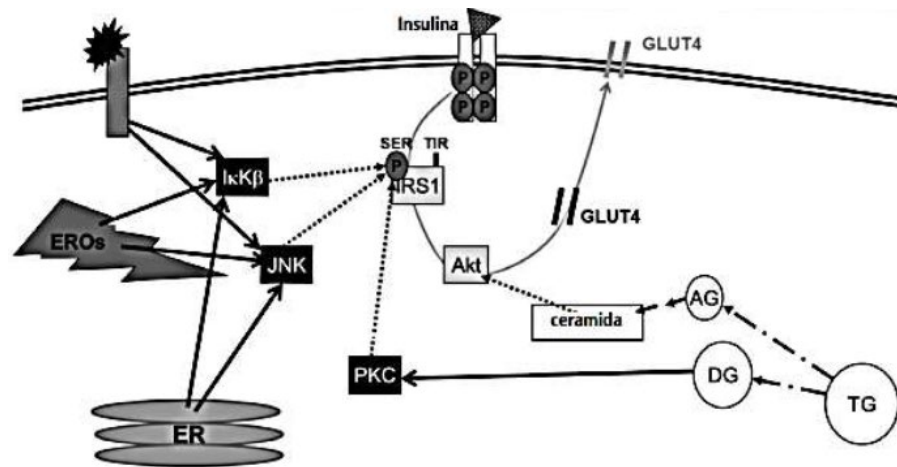
La insulina es una hormona anabólica de origen polipeptídico con un peso de 5.8 kD. la cual está formada por dos cadenas, llamadas A y B que se encuentran unidas entre

sí por enlaces disulfuro. La cadena A se compone de 21 aminoácidos y la cadena B de 30 aminoácidos (Carvajal *et al.*, 2017).

La insulina es sintetizada en los islotes de Langerhans en las células  $\beta$  pancreáticas; entre sus funciones metabólicas se encuentra la regulación de la homeostasis de la glucosa y los lípidos. Funcionalmente esta hormona disminuye las concentraciones de glucosa en sangre al favorecer el ingreso de glucosa hacia el musculo y tejido adiposo, inhibe la gluconeogénesis y la glucogenólisis y favorece la síntesis de glucógeno y de ácidos grasos en el hígado y en el tejido adiposo (Ortiz 2011).

Existe una condición metabólica llamada resistencia a la insulina (RI), en la que esta hormona no puede ejercer de manera eficiente su función a nivel celular y por lo tanto aumenta el riesgo de desarrollar diabetes (Méndez *et al.*, 2018).

Algunas de las alteraciones mediadas por la RI son: defectos en las vías de transmisión de señales generadas por la unión de la insulina al receptor; antagonismo por adipocinas derivadas del tejido adiposo (TNF- $\alpha$ , leptina, adiponectina) sobre la acción de la insulina; antagonismo por ácidos grasos no esterificados que interfieren con los procesos de captación, transporte y utilización de la glucosa en musculo esquelético y tejido adiposo, y el estrés oxidativo asociado a la función endotelial, que inhibe la señalización del receptor de insulina (Fig.7), (Martínez *et al.*, 2003).



**Figura 7.-** Mecanismos celulares que interfieren en la señalización de la insulina.

La insulina (triángulo) se une a su receptor de membrana, disparando su fosforilación y la de proteínas posreceptor (ej. sustrato del receptor de insulina [IRS1], Akt, etc. (Martínez *et al.*, 2003).

Esto determina la migración del transportador de Glucosa 4 (GLUT4) a la membrana, lo que facilita la captación de glucosa. En un proceso inflamatorio, los mediadores inflamatorios se unen a su receptor de membrana (estrella), lo cual activa (línea negra continua) a proteínas quinasas (ej. IκK y JNK). Estas proteínas inhiben a IRS1 (líneas punteadas) y reducen la señalización de insulina. Asimismo, las especies reactivas del oxígeno (EROs) y el estrés del retículo endoplásmico (ER) estimulan a IκK y JNK. Lípidos específicos también interfieren en la señalización insulínica al activar la proteína quinasa C (por diglicéridos), la cual inhibe a IRS1, o reduce la actividad de Akt (por ceramidas).

### 2.6.5 Dislipidemia

La dislipidemia (DLP) característica del SM es la presencia de hipertrigliceridemia, en la que se observan niveles de colesterol HDL bajos y elevados niveles de pequeñas partículas LDL densas, aunque estas últimas no se miden en la práctica cotidiana. Esta es la llamada “Dislipidemia aterogénica” por el ATP III, y representa el objetivo secundario del tratamiento de la DLP. Cuando el nivel de TG es  $\geq 500$  mg/dl, se debe

considerar el empleo de fibratos como fármacos de primera elección, para disminuir el riesgo de desarrollar pancreatitis aguda (Méndez et al., 2018).

### **Peroxidación lipídica**

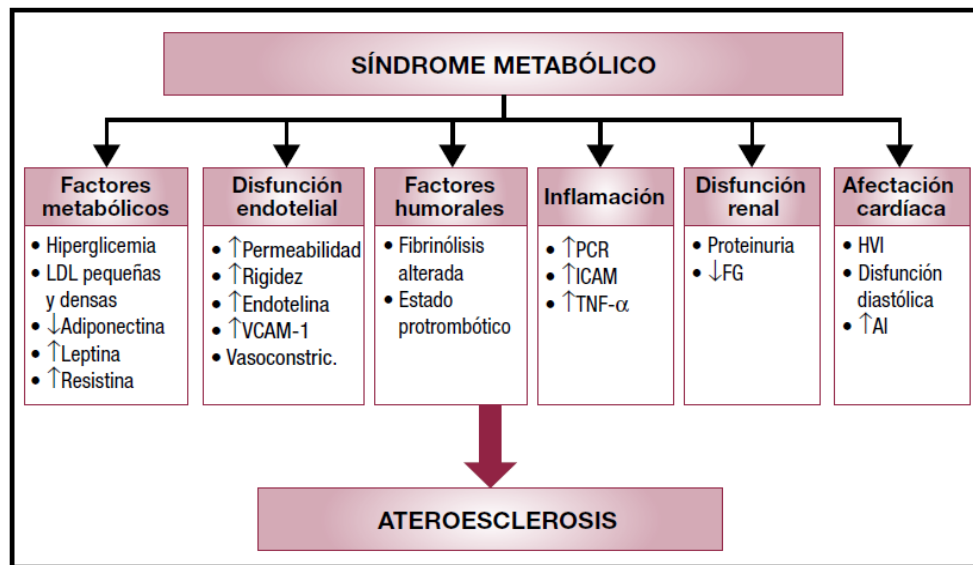
La peroxidación lipídica o lipoperoxidación hace referencia a la degradación oxidativa de los lípidos. Es el proceso a través del cual los radicales libres capturan electrones de los lípidos en las membranas celulares. Este proceso es iniciado por un mecanismo de reacción en cadena de un radical libre. En la mayoría de los casos afecta los ácidos grasos poliinsaturados, debido a que estos contienen múltiples dobles enlaces en grupos metileno (-CH<sub>2</sub>-) que poseen átomos de hidrógeno particularmente reactivos. Al igual que cualquier reacción con radicales libres, esta se modela en tres pasos fundamentales: iniciación, propagación y terminación, dando origen al malondialdehído y a otras moléculas (Cespedes & Castillo 2008).

### **2.6.6 Hipertensión Arterial**

La hipertensión arterial (HTA) en adultos se define como cifras de presión arterial (PA) sistólica y diastólica > 140/90 mm Hg (Pereyra *et al.*, 2016), relacionado a un proceso multifactorial ya que los mecanismos fisiopatológicos y causales implicados en la elevación de la PA se encuentran: disfunción endotelial, RI, obesidad, alteraciones de la función renal, así como determinantes genéticos y factores ambientales (Grima 2010).

Los pacientes con SM aún sin enfermedad renal o diabetes, presentan cifras de (PA) >130/80 mm Hg y se consideran de alto riesgo. Los mecanismos por los que el SM se asocia con la aterosclerosis son múltiples (Fig. 8).





**Figura 8.-** Mecanismos fisiopatológicos de aterosclerosis relacionados con el SM.

AI: aurícula izquierda; FG: filtrado glomerular; HVI: hipertrofia ventricular izquierda; LDL: lipoproteínas de baja densidad; PCR: proteína C-reactiva; TNF: factor de necrosis tumoral (Grima 2010).

El cambio a un estilo de vida saludable debe considerarse en todos los pacientes con SM, dado que el objetivo es reducir las cifras de PA a valores lo más cercano posible a los de referencia incluso en ausencia de HTA. Las elevaciones leves de la PA muchas veces pueden ser controladas con la disminución de peso, actividad física, restricción de sodio, aumento del consumo de vegetales y suplementos alimenticios (Grima 2010).

Las poblaciones que consumen predominantemente alimentos de origen vegetal y suplementos de polifenoles (Pacheco *et al.*, 2020) tienen niveles de PA más bajos y no suelen experimentar los aumentos de PA relacionados con la edad. Mientras que poblaciones con dietas con alto contenido de sodio y proteínas, presentan cifras tensionales más elevadas (Galina *et al.*, 2018).

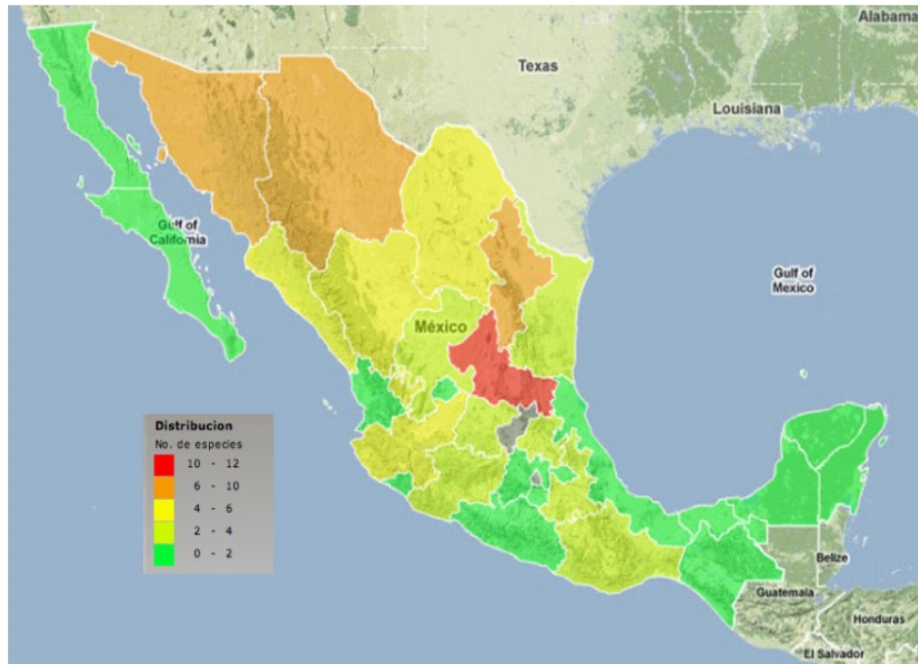
Estudios realizados con el extracto etanólico de las hojas de *A. muricata* (Guanábana) la cual contiene acetogeninas, tuvo un efecto hipoglucemiante al disminuir los niveles

de glucosa, óxido nítrico y malondialdehído (Arroyo *et al.*, 2012) Además, disminuyó los niveles de colesterol, triglicéridos y lipoproteínas de baja densidad. Mientras que, otro estudio realizado con extracto acuoso produjo un efecto hipotensor debido a la presencia de alcaloides, reticulina, coreximina, coclarina, anomurina, annomuricin E, annomuricina C, muricatocina C, gigantetroneina y muricapentocina de la planta (Palomino *et al.*, 2017). Extractos de hojas de orégano mexicano (*Lippia graveolens*) se han caracterizado por su actividad antioxidante, antimicrobiana antiinflamatoria, hipoglucemiante, (Pérez *et al.*, 2011) hipotensora atribuidos principalmente a su contenido en aceites esenciales y polifenoles como: apigenina, luteolina, naringenina ácido rosmarínico, ácido cafeico (Gutiérrez *et al.*, 2019).

## 2.7 Orégano

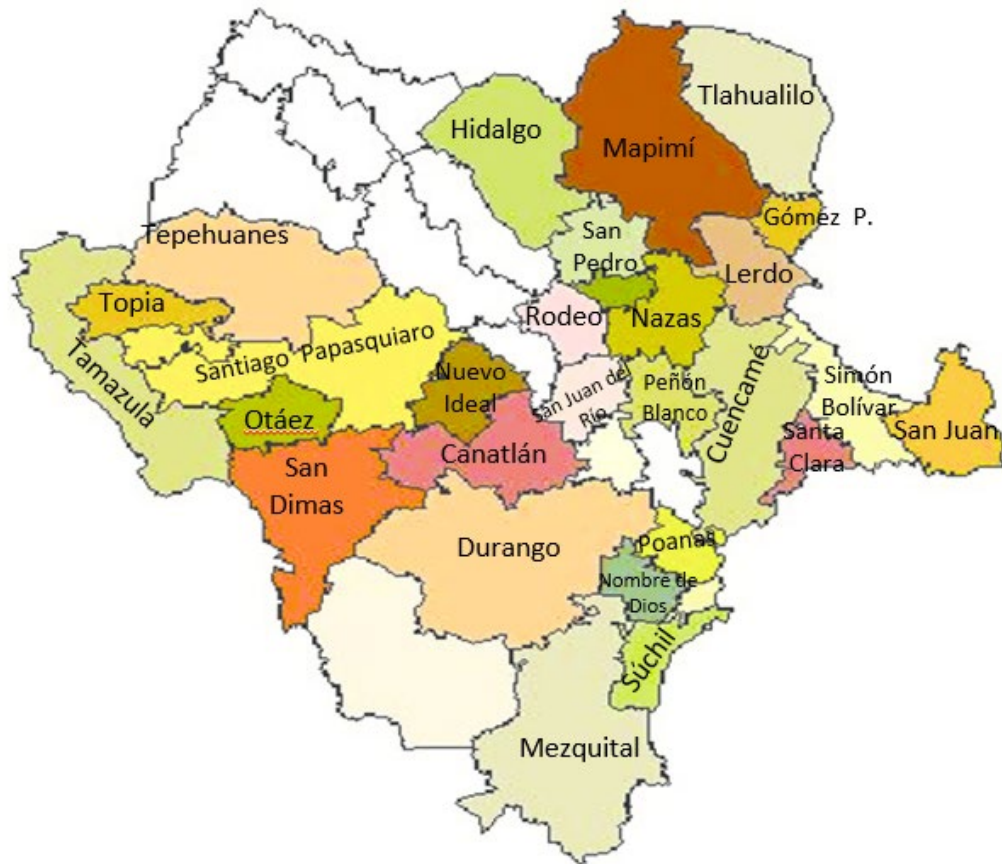
El orégano es una planta aromática de distribución mundial (Cortés *et al.*, 2021) representado principalmente por dos especies: *Origanum vulgare* (Lamiaceace) nativo de Europa, y *Lippia graveolens* (Verbenácea), originaria de América. México ocupa el segundo lugar como productor mundial de orégano con la especie *L. graveolens* H.B.K. sin embargo, la mayoría de las especies explotadas son silvestres y su cultivo es aún tradicional y limitado (García *et al.*, 2012; Asensio 2013).

En México se cultivan dos especies de importancia económica: *Lippia berlandieri* Shauer y *Lippia graveolens* HBK s.l. (Silva, 2005), arbustos que crecen de forma silvestre en regiones áridas y semiáridas del país, principalmente en Chihuahua, Durango, Tamaulipas, Coahuila, Jalisco, Zacatecas, Querétaro e Hidalgo (Fig.9), (Villavicencio, 2007).



**Figura 9.-** Mapa de la distribución de especies de orégano en México. Con base en la información disponible del Herbario Virtual de la Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad (CONABIO).

En el estado de Durango el orégano se encuentra ampliamente distribuido en gran parte del territorio estatal, pero solo se recolecta para su comercialización en los municipios de: El Mezquital, Nazas, Cuencamé, Lerdo, Mapimí, Nombre de Dios, Peñón Blanco, Poanas, Rodeo, San Juan de Guadalupe, San Pedro del Gallo, San Luis del Cordero, Santa Clara, Simón Bolívar y Tlahualilo, (Fig.10), (Flores 2009).



**Figura 10.-** Mapa de la distribución del orégano mexicano en el estado de Durango. Con base en la información disponible del Herbario Virtual de la Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad (CONABIO).

### 2.7.1 Descripción del orégano

El orégano es un arbusto perenne, iteróparo de larga vida, que se adapta a condiciones muy variadas de clima, preferentemente del tipo seco y semiseco. Sus principales hábitats se localizan en lugares poco accesibles como cerros, lomeríos, laderas, arroyos y cañadas de suelos alcalinos, generalmente pedregosos, de textura franco-arenosa, en un rango de altitud de 400 a 2000 metros sobre el nivel del mar (msnm) y, con mayor abundancia, entre 1400 y 1800 msnm (Villavicencio *et al.*, 2007, Orona *et al.*, 2017).

La especie está formada por poblaciones morfológicas, fenológicas y fitoquímicas distintas. Es un arbusto silvestre que alcanza hasta 2.5 m de altura. Tiene tallos ramificados que contienen una gran cantidad de hojas, las cuales representan la parte aprovechable de la planta. Esas hojas tienen un tamaño aproximado de 1 a 3 cm de largo y 0.5 cm de ancho, son opuestas, alternas y de forma ovalada con bordes dentados y poseen una textura rugosa con ligeras vellosidades. Este arbusto posee flores pequeñas de color blanco que forman inflorescencias en racimos, (Fig.11), cuyos frutos son pequeñas cápsulas que contienen semillas color café no mayores a 0.25 cm (Huerta, 1997).

### **Clasificación taxonómica**

Reino: Plantae

División: Magnoliophyta

Clase: Magnoliopsidae

Orden: Lamiales

Familia: Verbenácea

Género: *Lippia*

Especie: *graveolens*

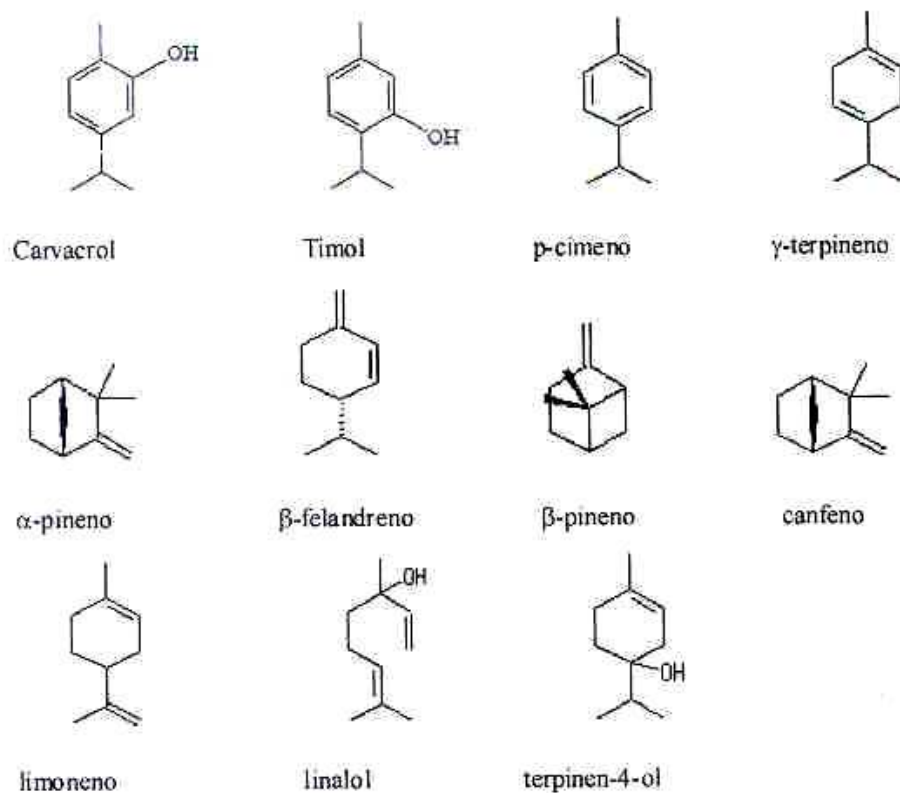


**Figura 11.-** Imagen de la planta de orégano mexicano *Lippia graveolens*

### 2.7.2 Composición química del orégano

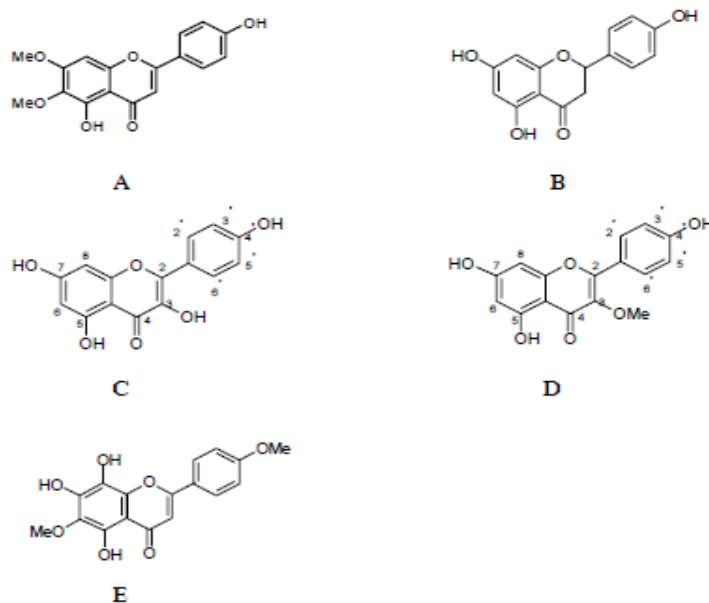
La concentración de los compuestos químicos presentes en el orégano y otros vegetales depende de la especie, altitud, tipo de suelo, clima, estado de crecimiento, y época de recolección (Asensio 2013; Cortés *et al.*, 2021).

Los compuestos más abundantes encontrados en el orégano son terpenoides y ácidos fenólicos. Los principales componentes químicos del aceite esencial, son el carvacrol y el timol, hidrocarburos monoterpénicos como el  $\gamma$ -terpineno y p-cimeno. (Fig. 12), (Arcila *et al.*, 2004), flavonoides reportados en hoja son: naringenina, pinocembrina, eriodictiol, taxifolina, quercetina, hesperidina entre otros, (Cortés *et al.*, 2021).



**Figura 12.-** Estructura química de los principales componentes del aceite de orégano mexicano, (Arcila *et al.*, 2004).

Entre los compuestos encontrados en el tallo del orégano mexicano se encuentran de tipo flavonoide: naringenina, kaempferol, circimaritina, pilosina, (Fig.13), (González *et al.*, 2007).



**Figura 13.-** Estructura química de compuestos detectados en el extracto de acetato de etilo del tallo de *Lippia graveolens*. circimaritina A, naringenina B, kaempferol C, isokaempferol D y pilosina E (González *et al.*, 2007).

Algunas propiedades de los extractos del orégano han sido estudiadas debido al creciente interés por sustituir los aditivos sintéticos en los alimentos. El orégano tiene una buena capacidad antioxidante y antimicrobiana contra patógenos como *Salmonella typhimurium*, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, (Asensio *et al.*, 2013, Hernández *et al.*, 2015). Estas características son muy importantes para la industria alimentaria ya que pueden favorecer la inocuidad y estabilidad de los alimentos y los protege contra alteraciones lipídicas, (Cortés *et al.*, 2021).

Existen algunos informes sobre el efecto anti-mutagénico y anti carcinogénico del orégano, lo que representa una alternativa potencial para el tratamiento y/o prevención

del cáncer (Arcila *et al.*, 2004). Otras propiedades que se atribuyen al aceite del orégano son: antiinflamatorio, antiséptico, analgésico, antioxidante, por lo que puede ser empleado en alimentos, industria farmacéutica y cosmética (Orona *et al.*, 2017; Arias *et al.*, 2020). La mayoría de los estudios referentes al orégano se enfocan en su contenido de aceites esenciales a los que se les atribuyen todas las propiedades antes mencionadas. Sin embargo, son pocos los estudios que evalúan los compuestos químicos que se puedan extraer del tallo. (González *et al.*, 2007).

## **2.8 Uso de residuos vegetales con potencial nutracéutico**

La recolección del orégano se realiza después del periodo de lluvias durante los meses de septiembre a octubre, se corta hasta un 75% del arbusto que incluye el ramaje con hojas (SEMARNAT, 1997), pero únicamente se comercializa la hoja que representa la variable de interés por su gran valor económico por el uso de su aceite esencial, el resto tallos y hojas sin aceite “bagazo” se desecha convirtiéndose en un residuo vegetal.

Se consideran residuos a las partes que quedan de un todo, luego de haber sufrido un proceso de transformación natural o artificial que puede modificar o no sus características fisicoquímicas y estructurales iniciales (Sztern *et al.*, 1999). Estos residuos generalmente son quemados generándose un desaprovechamiento y una pérdida total de materia orgánica y de los nutrientes que éste contiene. Las alternativas generalmente utilizadas para el aprovechamiento de los residuos de plantas son como: alimento animal, fuente energética y abono (Corral 2011). Los avances en el estudio de la composición fitoquímica y su relación con nuevas propiedades nutracéuticas hacen de las hojas (Bagazo) y tallo del orégano, productos de alto valor comercial con amplias aplicaciones quimioterapéuticas (García *et al.*, 2012).



### 3. JUSTIFICACIÓN

Cada día se incrementa la importancia en el consumo de productos nutraceuticos, que ayuden a prevenir o contribuir en el tratamiento de las enfermedades que han cobrado especial interés por su frecuencia en años recientes como: cáncer, enfermedades cardiovasculares, hipercolesterolemia, diabetes mellitus tipo II, SM, entre otras enfermedades.

Las propiedades del orégano mexicano con fines farmacéuticos, cosméticos, y culinarios está en sus hojas (aceite). Sin embargo, la parte no aprovechable de la planta representa del 70% al 80% de masa total, residuos empleados principalmente en composta, alimento para ganado o son quemados.

Por lo que debido a la concentración de polifenoles presentes en los residuos de orégano y determinar su actividad antioxidante, biológica y toxicológica, se puede realizar un aprovechamiento más integral de estos residuos con alguna aplicación nutraceutica.

## 4. HIPOTESIS

Los extractos polifenólicos obtenidos de los residuos de hoja y tallo del orégano mexicano (*Lippia graveolens*), tienen propiedades nutracéuticas y un efecto favorable en el SM.

## 5. OBJETIVOS

### 5.1 OBJETIVO GENERAL

Evaluar las propiedades nutraceuticas de los residuos de orégano mexicano en un modelo murino con síndrome metabólico.

### 5.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1.- Evaluar la concentración de polifenoles de extractos crudos de hojas y tallos de orégano (*Lippia graveolens*).

2.- Evaluar la actividad antioxidante *in vitro* DPPH, ABTS, FRAP y la inhibición de las enzimas  $\alpha$ -amilasa y  $\alpha$ -glucosidasa de los extractos de hoja y tallo.

3.-Identificar los principales polifenoles en los extractos en la hoja y tallo mediante HPLC-DAD y UPLC-DAD- MS.

4.- Evaluar el efecto toxicológico y citotóxico de los extractos de hojas y tallos.

5.- Evaluar el efecto del extracto de tallo sobre marcadores bioquímicos en ratones con SM.

## 6. MATERIALES Y MÉTODOS

### 6.1 Materiales

Residuos de hojas y tallos del orégano.

#### 6.1.1 Colecta de hojas y tallos de *Lippia graveolens*

Las muestras se obtuvieron de la empresa Unión de Cooperativas Oro Verde del Desierto, ubicada en Cuencamé Dgo. (24° 52' 12" N; 103° 41' 45" O), colectadas durante el periodo de septiembre a octubre del 2017. el orégano de esta zona corresponde a *Lippia graveolens* muestras representativas que se encuentran en el herbario del Instituto Politécnico Nacional (CIIDIR-IPN) Durango, con números de registros: 35542, 37563 y 40073. Las muestras (bagazo y tallos) se entregaron en polvo y se hicieron pasar por malla número 60, se guardaron en bolsas de polietileno a 5°C para posteriormente realizar los análisis correspondientes.

### 6.2 Métodos

**La etapa experimental se realizó de la siguiente manera:**

- a) Recolección de los residuos de hojas y tallos los cuales se tamizaron por la malla No. 60.
- b) Obtención de extractos con: etanol-agua (30%, 50% y 80 %), masa:solvente (1/10, 1/20, 1/30).
- c) Evaluación de sólidos totales, fenoles totales y flavonoides.

Cada etapa experimental corresponde a un objetivo específico, por lo que se siguieron en ese orden.

### 6.2.1 Obtención de extractos

Para evaluar el efecto del solvente y de la relación masa:solvente (M:S) como parámetros de extracción, se utilizaron los extractos a partir de hojas y tallos secos. Se empleó como solvente de extracción soluciones etanol-agua al 30%, 50% y 80%; así como las relaciones M:S 1/10, 1/20 y 1/30.

La preparación consistió en macerar los extractos de hoja y tallo (5 g) de cada uno los cuales se hicieron por duplicado en las diferentes concentraciones de etanol-agua (30%, 50% y 80%;) a los volúmenes de 100 ml, 150 ml y 200 ml para la relación M:S, 1/10, 1/20, 1/30. Se agitaron en un equipo orbital Shaker a 150 rpm, a temperatura ambiente ( $25^{\circ}\text{C}\pm 3^{\circ}\text{C}$ ) por 24h en ausencia de luz, después de la agitación se filtraron los extractos en papel Whatman No. 4. A las muestras remanentes se le adicionó nuevamente solvente fresco para completar su volumen inicial. Los extractos obtenidos de la primera y segunda maceración se combinaron y concentraron en rota vapor Büchi R-200 a  $45^{\circ}\text{C}$  aplicando vacío, obteniendo un extracto acuoso concentrado, el cual se llevó a sequedad en la campana de extracción a fin de obtener un extracto pulverizado.

De los extractos obtenidos se evaluó el contenido de sólidos totales, polifenoles, flavonoides, la capacidad antioxidante mediante las técnicas: DPPH, FRAP y ABTS.

#### 6.2.1.1 Determinación de rendimientos

Se evaluó el rendimiento en sólidos (% p/p) disueltos en el solvente de extracción. El resultado corresponde al porcentaje en peso del extracto seco con respecto a la cantidad de muestra seca de hoja y tallo respectivamente, aplicando la siguiente fórmula.

$$\text{ST (\%)} = (\text{SE/MS}) * 100$$

Donde:

ST= Sólidos totales.

SE= peso de Sólidos extraídos

MS= peso de muestra seca

Todas las determinaciones se realizaron por triplicado.

### **6.2.1.2 Determinación del contenido de Fenoles Totales (FT)**

Los métodos usados comúnmente para determinar y cuantificar fenoles totales en alimentos y vegetales son el ensayo de la vainillina y el de Folin-Ciocalteu. El método de Folin-Ciocalteu se basa en la capacidad de los fenoles para reaccionar con agentes oxidantes. El reactivo de Folin-Ciocalteu contiene molibdato y tungstato sódico, que reaccionan con cualquier tipo de fenol, formando complejos fosfomolibdico-fosfotúngstico. La transferencia de electrones a pH básico reduce los complejos fosfomolibdico-fosfotúngstico en óxidos, cromógenos de color azul intenso, de tungsteno ( $W_8O_{23}$ ) y molibdeno ( $Mo_8O_{23}$ ), siendo proporcional este color al número de grupos hidroxilo de la molécula (Gutiérrez *et al.*, 2008).

Se cuantificó el contenido fenólico de los extractos de tallo y hoja siguiendo la metodología de Folin-Ciocalteu, Se tomaron 50  $\mu$ l de extracto a concentración de 1000 ppm, equivalente a 0.05 mg de extracto seco. se le adicionaron 3.95 ml de agua destilada y posteriormente se le añadieron 250  $\mu$ l del reactivo de Folin-Ciocalteu (2N). Después de un minuto y antes de 8 se adicionaron 750  $\mu$ l de carbonato de sodio (20%). Se agitaron y se dejaron en reposo por 2 horas. Se utilizó una curva de calibración con ácido gálico a concentraciones de 100, 200, 300, 400 y 500 ppm. Se midió la absorbancia a 760 nm contra un blanco sin muestra y los resultados se expresaron como equivalentes de ácido gálico en mg/g de extracto seco (mgEAG/g). Las determinaciones se realizaron por duplicado.

### 6.2.1.3 Determinación de Flavonoides Totales (FL)

Este ensayo se determinó por la técnica propuesta por Heilmer *et al.*, 2005, cada uno de los extractos secos se diluyó con etanol al 50 % a una concentración de 1000 ppm.

De cada uno de los extractos diluidos se tomó una alícuota de 250  $\mu$ l y se le adicionaron 75  $\mu$ l de nitrito de sodio 5%, 150  $\mu$ l de cloruro de aluminio 10% (recién preparada) y 500  $\mu$ l de hidróxido de sodio 1M. Se ajustó a un volumen final de 2.5 ml con agua destilada. Se dejó en reposo durante 5 min, después se midió la absorbancia a 510 nm contra blanco sin muestra. Se construyó una curva de calibración con catequina a cinco concentraciones, (100, 200, 300, 400, 500 mg/L). Los resultados se expresaron como equivalentes de catequina en mg/g de extracto seco (mg EC/g). Las determinaciones se realizaron por duplicado.

### 6.2.1.4 Evaluación de capacidad antioxidante mediante DPPH

Este es un método *in vitro* ampliamente utilizado por ser estable, simple y reproducible para investigar la capacidad de captura de radicales libres de sustancias antioxidantes de carácter lipofílico, es decir la donación de átomos de hidrógeno a radicales libres. El ensayo de DPPH se basa en la estabilidad del radical 2,2- difenil-2-picrilhidrazil (DPPH) al cual se le atribuye la deslocalización del electrón desapareado, esta deslocalización le otorga una coloración violeta caracterizada por una banda de absorción, en solución etanólica, centrada alrededor de 520 nm. Cuando una disolución de DPPH entra en contacto con una sustancia que puede donar un átomo de hidrógeno o con otra especie radical (R) se produce la forma reducida DPPH-H o DPPH-R con la consecuente pérdida del color y por lo tanto la pérdida de la absorbancia El parámetro  $CI_{50}$ , es la concentración necesaria para obtener un 50% de efecto inhibitorio es generalmente usado para la interpretación de este método (Heimler *et al.*, 2005; Huang *et al.*, 2005).

Se siguió el procedimiento propuesto por Brand-Williams *et al.*, 1995, se preparó una solución del radical DPPH (2,2-difenilo-1-picrylhidracilo) a concentración de 3 mg/100 ml, disuelta en etanol al 96%. Los extractos se disolvieron en etanol al 50% a una

concentración de 500 mg/l. Se adicionaron en un tubo de ensayo 50 µl de extracto y 1950 µl de la solución DPPH, se agitó, y se mantuvieron en la oscuridad a temperatura ambiente (25°C) durante 30 min. Para el control se utilizó etanol al 50% en lugar de muestra. Transcurrido el tiempo se midió la absorbancia de la muestra ( $A_m$ ) y del control ( $A_c$ ) en un espectrofotómetro a una longitud de onda de 500nm.

Para la determinación de la  $CI_{50}$  se realizó una curva con concentraciones de 500, 1000 y 1500 ppm de DPPH y de los extractos. Las determinaciones se realizaron por triplicado.

### **6.2.1.5 Evaluación de capacidad antioxidante mediante ABTS**

El método del ABTS se utiliza ampliamente para materiales tanto lipofílicos como hidrofílicos, el compuesto cromógeno ABTS presenta color azul/ verde con un máximo de absorción a 342 nm, soluble en agua y químicamente estable.

El radical ABTS. Se genera tras una reacción que puede ser química (dióxido de manganeso  $MnO_2$ , persulfato de potasio,  $K_2S_2O_8$ ), enzimática (peroxidasa, mioglobulina) o electroquímica. Una vez generado el radical su espectro presenta máximos de absorbancia a 414, 645, 734 y 815 nm en medio alcohólico (Kuskoski et al., 2005).

El radical ABTS. es más indicado para ensayos de compuestos coloridos ya que tiene la ventaja de presentar absorción máxima próxima a la región infrarroja (734nm), reduciendo posibilidades de interferencias de compuestos coloridos que absorben en la región visible.

Se realizó de acuerdo a la metodología propuesta por Re et al., 1999, con algunas modificaciones. El radical ABTS (Acido 2,2'-azino-bis-(3-etilbenzotiazolina)-6-sulfónico) se obtuvo mediante la reacción de ABTS (7mM) con  $K_2S_2O_8$  2.45 mM. Posteriormente se aforó con agua a un volumen de 10 ml e incubó a temperatura ambiente (25°C) con agitación y en la oscuridad durante 16 h. Formado el radical ABTS



se colocó en viales de 1 ml y se guardó en congelación a  $-7^{\circ}\text{C}$ . Se diluyó 1ml del ABTS con etanol hasta obtener un valor de absorbancia comprendido entre 0.70 ( $\pm 0.1$ ) a una longitud de onda de 754 nm. Los extractos se disolvieron en etanol a una concentración de 200 mg/l. En un tubo de ensayo se depositaron 50  $\mu\text{l}$  de muestra y 1950  $\mu\text{l}$  de ABTS, se agitaron y mantuvieron en la obscuridad durante 10 min. Para el control (Ac) se utilizó etanol en lugar de muestra (Am). Se utilizó luteína y naringenina como estándares de referencia. Posteriormente se leyó la absorbancia a 754 nm, tanto de la muestra, como del control.

Los resultados se expresaron como porcentaje de inhibición, los cuales se obtuvieron de acuerdo a la siguiente fórmula:

$$\% \text{ ARL} = \left[ \frac{Ac - Am}{Ac} \right] \times 100$$

Las determinaciones se realizaron por duplicado.

### 6.2.1.6 Evaluación de la capacidad antioxidante mediante FRAP

EL método FRAP mide la capacidad de los antioxidantes para reducir el complejo férrico 2,4,6-Tris(2-piridil)-s-triazina  $[\text{Fe}^{+3}(\text{TPTZ})_2]^{+3}$  al complejo ferroso de color azul intenso  $[\text{Fe}^{+2}(\text{TPTZ})_2]^{+2}$  en medio ácido. Este método mide la potencia reductora en plasma, pero actualmente ha sido adaptado y usado para ensayo de antioxidantes en alimentos principalmente de carácter hidrofílico ((Gülçin 2012).

La evaluación de la capacidad antioxidante mediante FRAP (Poder Antioxidante Reductor del Fierro), se realizó de acuerdo al procedimiento descrito por Rosales-Castro *et al.*, 2012.

El FRAP fue preparado con buffer acetato a 300mM (pH 3.6), TPTZ (2, 4,6- tri [2-pyridil]-s-triazine) 10 mM disuelto en HCl a 40 mM, y una solución de cloruro férrico ( $\text{FeCl}_3$ ) a 20 mM, a una relación 10:1:1. Posteriormente se mezclaron 100  $\mu\text{l}$  de extracto (200 mg/l) con 3 ml de FRAP y se incubaron a  $25^{\circ}\text{C}$  durante 10 min.

Transcurrido el tiempo, la absorbancia se midió a 593 nm. El blanco consistió en 3ml reactivo de FRAP y 100  $\mu$ l de diluyente empleado en la muestra (agua destilada). Se utilizó naringenina y luteolina como estándares de referencia. Se realizó una curva de calibración con Trolox 500 mM (100, 200, 250, 300 y 400 mg/l). Los resultados se expresan como mM equivalentes de Trolox (mMTE). Las determinaciones se realizaron en dos experimentos independientes por duplicado.

### **6.3 Evaluación de la actividad inhibitoria *in vitro* de las enzimas $\alpha$ -amilasa y $\alpha$ -glucosidasa en los extractos de hojas y tallos**

Uno de los enfoques terapéuticos más importantes para disminuir la hiperglicemia postprandial es retardar la absorción de la glucosa a través de la inhibición de las enzimas que hidrolizan carbohidratos como  $\alpha$ -amilasa y  $\alpha$ -glucosidasa (Sevilla *et al.*, 2013). Por lo que la evaluación clínica más común en la gestión del SM y DM2, implica la prescripción de inhibidores de enzimas como acarbosa para  $\alpha$ -glucosidasa y  $\alpha$ -amilasa. Sin embargo, la ingesta continua de algunos de estos medicamentos puede causar efectos tales como: malestar gastrointestinal, flatulencia, distensión abdominal, calambres y diarreas (López *et al.*, 2013, Gutiérrez *et al.*, 2019).

#### **6.3.1 Inhibición de la enzima $\alpha$ -amilasa**

La evaluación del efecto inhibitor se llevó a cabo siguiendo la metodología propuesta por Kwon *et al.* (2008), con ligeras modificaciones. A 500  $\mu$ l de extracto se le adicionaron 500  $\mu$ l de la solución enzimática la cual se preparó a una concentración de 0.5 mg/ml, y se disolvió en buffer de fosfato de sodio, 0.02 M a pH 6.9 con 0.006M de NaCl, posteriormente se incubó a 25°C durante 10 min. Después de la pre-incubación, se adicionaron 500  $\mu$ l de una solución de almidón al 1% (disuelto en buffer fosfatos de sodio 0.02M); y nuevamente se incubó a 25°C durante 10 min. Una vez concluido el tiempo, la reacción se detuvo con 1 ml de ácido dinitrosalicílico (DNS) y se llevó a ebullición en baño maría durante 5 min. Por último, se dejó enfriar a temperatura ambiente y se adicionaron 10 ml de agua destilada. La absorbancia se

midió a 540 nm. La acarbosa se empleó como control de referencia, se preparó un control experimental (Ac) al cual se le adiciona 500  $\mu$ l de buffer fosfatos de sodio (en lugar de extracto (Am), puesto que éste fue el referente donde se llevó a cabo el 100% de la reacción.

Los resultados se expresaron como  $CI_{50}$ , Las determinaciones se realizaron por duplicado.

### **6.3.2 Inhibición de la enzima $\alpha$ -glucosidasa**

La determinación de la actividad de inhibición de la enzima  $\alpha$ -glucosidasa se realizó de acuerdo a la metodología de Vongsak *et al.*, (2015) con algunas modificaciones. A 100  $\mu$ l de extracto a 2500 ppm se adicionaron 20  $\mu$ l de enzima a una concentración de 0.9 mg/ml (se disolvió en buffer fosfatos de sodio 0.01M pH 7.4) y 800  $\mu$ l de buffer fosfatos de sodio 0.01M. La mezcla se incubó a 37°C durante 10 min, posteriormente se añadieron 20  $\mu$ l de p-nitrophenyl- $\alpha$ -D-glucopyranoside (p-NPG) 20 mM y 800  $\mu$ l de carbonato de sodio ( $NaCO_3$ ) 0.1M, se volvió a incubar a 37°C por 75 min. La absorbancia se determinó a 405 nm. La acarbosa se empleó como control de referencia. Se preparó un control experimental (Ac) al cual se le adicionan 100  $\mu$ l de buffer fosfatos de sodio en lugar de extracto (Am), puesto que éste fue el referente donde se llevó a cabo el 100% de la reacción.

Los resultados se expresaron como  $CI_{50}$ , Las determinaciones se realizaron por duplicado.

### **6.4 Identificación de polifenoles en los extractos de hoja y tallo de orégano mexicano.**

#### **6.4.1 Comparación cualitativa de los compuestos fenólicos de los extractos de hoja y tallo del orégano mexicano mediante HPLC-DAD.**

Esta evaluación consistió en un análisis cromatográfico de los extractos (ET30, ET50, ET80) de hojas y tallos y relación M:S 1/30, con la finalidad de realizar una comparación cualitativa entre los compuestos que se extraen con las diferentes concentraciones de etanol y determinar el efecto del solvente sobre la extracción de los compuestos.

El análisis por HPLC-DAD se llevó a cabo de acuerdo a la metodología descrita por Gutiérrez-Macías *et al.* 2016. Se utilizó un equipo de cromatografía líquida de alta resolución acoplado a un detector de arreglo de diodos (HPLC-DAD Infinity 1260 Series, Agilent Technologies, Palo Alto, CA, EE. UU.). Se diluyeron 5 mg de cada uno de los extractos en 5 ml de MeOH. Se filtraron en acrodiscos de nylon de poro de 0,2  $\mu\text{m}$ . El volumen de inyección fue de 20  $\mu\text{l}$ . Los compuestos fenólicos se separaron a 25 °C en una columna ZORBAX Eclipse Plus C<sub>18</sub> (4.6 x 150 mm, 5  $\mu\text{m}$ ; Agilent Technologies), empleando ácido acético al 2.5% a pH 2.8 (fase A) y acetonitrilo (fase B) como fase móvil, a un flujo de 1 ml min<sup>-1</sup>, de acuerdo al siguiente gradiente: 0 a 24% de B en 27 min, 24% a 100% del minuto 27 al 40, regresando al 100% de A del minuto 40 al 43 min. Los compuestos fenólicos se monitorearon a 280 nm y 360 nm. Solo se consideraron los compuestos que mostraron una mayor absorbancia.

Después de obtener los cromatogramas se efectuó un análisis de presencia (1), ausencia (0) de compuestos a los diferentes tiempos de retención, en las seis muestras analizadas. Con la información de presencia/ausencia se elaboró un análisis de conglomerados mediante el algoritmo UPGMA y el índice de Jaccard utilizando el programa PAST versión 3.21.

#### **6.4.2 Identificación de compuestos fenólicos por UPLC-DAD-MS**

Se utilizó un cromatógrafo de líquidos de ultra alta resolución Acquity UPLC® (Waters), acoplado a un espectrómetro de masas (UPLC/MS), con un modo de ionización negativa (ESI<sup>-</sup>). Se utilizó una columna C<sub>18</sub> de fase inversa (2,1 x 100 x 1,7  $\mu\text{m}$ ) y se

mantuvo a 30 ° C. La fase móvil utilizada fue ácido fórmico 7,5 mM (Fase A) y Acetonitrilo (Fase B) a 0,210 ml/min, en un tiempo de 16 min, con el siguiente gradiente binario: 0 min, 97% A; 1,23 min, 91% de A; 3,82 min, 84% A; 11,4 min, 50% de A; 13,24 min, 97% A, 15,0 min, 97% A.

El espectrómetro de masas se fijó a 150°C, una temperatura de solvatación de 450°C, un flujo de gas de cono de 151 L / h un flujo de N<sub>2</sub> de 796 L / h. Se utilizó metanol como codisolvente con ácido fórmico al 0,1%. Se utilizó el modo de ionización de reacciones múltiples para los ensayos MS/MS a voltaje capilar 2.5 kV, temperatura de desolvatación 400°C, temperatura de la fuente 150°C, flujo de gas desolvatación 800 L/h, flujo de gas de cono 150 L/h; el flujo de gas de colisión fue de 0,13 ml/min, la energía de colisión del modo MS, 5,0 y la energía de colisión del modo MS / MS, 20,0. Los compuestos se identificaron mediante la interpretación de sus espectros de masas, a través del MS/MS y utilizando estándares (Sigma-Aldrich) de diferentes compuestos fenólicos (ácidos fenólicos y flavonoides). Los resultados se reportaron como porcentaje relativo, que corresponde a la respuesta de cada compuesto con respecto a la respuesta total en un cromatograma de UPLC.

### **6.5 Animales de experimentación**

Los animales de experimentación de este estudio fueron ratones hembras y machos CD1, los cuales se obtuvieron del bioterio de la Escuela Nacional de Ciencias Biológicas del Instituto Politécnico Nacional. Todos los experimentos se sujetaron a los lineamientos marcados por el Comité de Bioética de la Escuela Nacional de Ciencias Biológicas-IPN (CONBIOETICA09CEI03720130520) y fueron conducidos en conformidad con la NOM-062-200-1999 especificaciones técnicas para la producción, cuidado y uso de animales de laboratorio.

Los animales se alojaron en jaulas de policarbonato en ambiente controlado a temperatura de 21°C ± 2°C, con ciclos de 12 h luz/oscuridad y acceso a alimento y agua *ad libitum*.

### **6.5.1 Evaluación del efecto toxicológico y citotóxico de los extractos.**

La determinación de los efectos tóxicos de los extractos de orégano se llevó a cabo con las pruebas de dosis letal media (*in vivo*) y citotoxicidad (*in vitro*).

### **6.5.2 Evaluación de dosis letal media (DL50) Toxicidad aguda**

Para la realización de este experimento se siguió la metodología propuesta por la OECD-423–1991 (Guía para la prueba de productos químicos, toxicidad aguda oral), que considera el empleo de roedores sanos hembras y machos, y señala las dosis a seguir de acuerdo con el empleo de los extractos a evaluar.

Se utilizaron en total 36 ratones sanos 18 ratones hembra y 18 ratones macho de la cepa CD1 de 25 a 30 ± 5 g de peso corporal, y de 6 a 8 semanas edad, se formaron inicialmente y en forma aleatoria 2 grupos de ratones macho y 2 grupos de ratones hembras (n=3) cada uno. Todos los grupos contaron con ayuno previo de 4h y la administración de los extractos de hoja (EH) y tallo (ET) se realizó por vía intragástrica, los primeros grupos de ratones hembra recibieron una dosis de 500 mg/Kg cada uno, de extractos EH y ET, el mismo procedimiento fue para el grupo de ratones macho, después de un tiempo de observación de 40 min y de no manifestar ningún grupo algún signo de toxicidad, se siguió el mismo procedimiento para la selección de los siguientes cuatro grupos de ratones pero ahora la dosis administrada fue de 1000 mg/Kg de peso corporal.

La evaluación consistió en determinar el número de animales que presentaran muerte espontánea y subsecuente en las primeras 4 h, así como la presencia de letargo, convulsión, diarrea y piloerección, durante las siguientes 24 h. De encontrar negativos todos los aspectos a evaluar, se procedió a la administración de una dosis más alta según la tabulación que marca la metodología OECD 423. La dosis siguiente administrada a los cuatro grupos restantes de ratones fue de 2000, mg/kg de peso corporal. (se utilizó una solución de carboximetilcelulosa al 0.05 % como vehículo). Los efectos toxicológicos se expresaron en términos de mortalidad, definida como DL50.

### **6.5.3 Evaluación citotóxica *in vitro***

Una línea celular es un grupo de células de tipo único (animal o vegetal) que se han adaptado para crecer continuamente *in vitro* y que se usan en investigación. Las líneas celulares derivadas de neoplasias humanas, se han convertido en una de las principales herramientas de apoyo para realizar evaluación citotóxica de extractos vegetales, siendo una técnica sensible, que genera resultados reproducibles y válidos. Por estas razones las muestras cancerígenas *in vivo* fueron remplazadas por un sistema *in vitro* el cual comprende cerca de 60 líneas celulares de tumores cancerígenos humanos (Ávalos *et al.*, 2009).

El efecto de los extractos sobre las líneas celulares SK-LU-1 y HFF-1 se evaluó mediante un ensayo colorimétrico el cual emplea la sal de tetrazolio (bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-yl)-2,5-difeniltetrazolio, MTT). Este ensayo mide la proliferación celular debido a la reducción metabólica de esta sal de color amarillo, por la acción de enzimas deshidrogenasas mitocondriales. El compuesto resultante (azul de formazan) se solubilizó y cuantificó espectrofotométricamente. A las líneas celulares se les aplicó distintas dosis de EC, con la que se determinó su efecto sobre la viabilidad celular, la  $CI_{50}$ , e índice de selectividad.

#### **\* Líneas celulares y condiciones de cultivo celular**

La línea tumoral SK-LU-1 (cáncer de pulmón), y la línea celular normal HFF-1 fueron obtenidos de ATCC, USA (American Tissue Culture Collection).

Las células SK-LU-1 y HFF-1 fueron cultivadas con medio DMEM alto en glucosa, suplementado con suero fetal bovino al 10% y 1% de antibiótico (Estreptomicina/Anfotericina 1000 U/ml). Las células se incubaron a 37°C en cámara húmeda, en una atmósfera al 5% de CO<sub>2</sub>.

### \* Ensayo de viabilidad

La viabilidad celular se midió mediante la sal de tetrazolio MTT (bromuro de 3- (4,5-dimetiltiazol-2-il) -2,5-difeniltetrazolio), de acuerdo a la metodología propuesta por Mosmann 1983.

Cada línea celular se colocó en placas de 96 pocillos a una densidad de  $8 \times 10^3$  células/pocillo; y se incubaron a 37°C, con aire humidificado y 5% de CO<sub>2</sub> durante 24 h para permitir su adherencia a la placa. Después el medio se reemplazó con 200 µl de los extractos de hoja y tallo a diferentes concentraciones (se obtuvieron a partir de las diluciones de una solución madre del extracto en cuestión; y luego se añadieron al medio de cultivo). Las células sin tratamiento se emplearon como control negativo, y como control positivo se empleó cisplatino (neoplásico) cuya viabilidad se expresó en porcentaje.

Posteriormente las células se incubaron durante 24h y 48h en las condiciones antes mencionadas. Transcurrido el tiempo se añadieron 100 µl de MTT (5 mg/ml, disuelto en medio de cultivo) en cada pocillo; se incubó durante 4h, después se decantó el medio y los cristales de formazán se disolvieron en 150 µl de dimetilsulfóxido (DMSO). y la densidad óptica (DO) se leyó en un lector de microplacas de ELISA MRX Revelation Dynex Technologies a 550 nm. Los valores de CI<sub>50</sub> de cada extracto se determinaron a partir de las curvas de concentración-efecto (% proliferación celular a las 24h y 48h), el ensayo se realizó por triplicado en tres ensayos independientes utilizando la siguiente ecuación:

$$\% \text{ Viabilidad} = [(Abs \text{ cel. tratadas} - Abs \text{ Bco.}) / (Abs \text{ cel. control} - Abs \text{ Bco.})] \times 100$$

Para determinar la selectividad citotóxica de las sustancias evaluadas, se calculó el índice de selectividad, según la fórmula:

$$CI_{50} \text{ de la línea normal} / CI_{50} \text{ de la línea tumoral}$$



Si el valor es  $\geq 2$  indica que el extracto no es tóxico para células normales.

## **6.6 Evaluación del efecto de los extractos sobre marcadores bioquímicos en ratones con SM.**

### **6.6.1 Obtención de crías e inducción del SM**

La obesidad es un factor de riesgo para múltiples enfermedades. Existen diversos modelos en roedores para inducir obesidad, los modelos genéticos y la obesidad inducida por la dieta son costosos. Dentro de los modelos hipotalámicos de obesidad está el que se logra mediante la administración de glutamato monosódico (GMS) en período neonatal, esta sustancia no es costosa y produce las alteraciones metabólicas más importantes que se ven en la obesidad humana.

Para inducir el SM en ratones neonatales se siguió la metodología propuesta por Suárez *et al.*, 2015, siguiendo un esquema de tratamiento de 5 dosis vía subcutánea con GMS y para el grupo control se empleó una solución isotónica de NaCl A al 0.9%. Se emplearon ratones CD1 hembras y machos de 25 a 30 g de peso y se colocaron 3 hembras por 1 macho para los acoplamientos. Con ciclos de 12 h luz/oscuridad, alimento y agua *ad libitum*. Condiciones de humedad y temperatura controladas.

De las hembras gestantes se utilizaron sus crías. Se consideró el día del nacimiento como día cero. Se formaron dos grupos en forma aleatoria de 15 ratones hembras cada grupo para la administración de NaCl y GMS vía subcutánea respectivamente.

- 1.- Grupo control recibió NaCl
- 2.- Grupo experimental al que se le indujo el SM recibió GMS

Al grupo control se le administró 0.02 ml/g de peso de ratón de solución salina isotónica, vía subcutánea el segundo y cuarto día posnatal. Para el sexto, octavo y

décimo día posterior al nacimiento, se incrementó al doble (0.04 ml) la dosis administrada de solución salina isotónica por vía subcutánea.

Al grupo experimental se le administró 2 mg/g de peso de GMS vía subcutánea el segundo y cuarto día posnatal. Para el sexto, octavo y décimo día posterior al nacimiento se incrementó la dosis al doble (4 mg/100 g) de GMS por vía subcutánea.

En la semana 4 después del nacimiento se llevó a cabo el destete de todos los ratones los cuales fueron marcados y colocados por grupos (Control y GMS) en forma aleatoria en número de 4 a 5 ratones por caja.

Se inició la segunda etapa experimental a partir de la semana 13, separando en forma aleatoria a los ratones (n=6) a los que previamente se les había administrado NaCl y GMS, quedando los grupos de la siguiente manera:

1) Testigo Hembra (Control)

**El grupo Síndrome metabólico se dividió en dos grupos:**

2) Síndrome Metabólico (SM) Hembra (GMS).

3) Síndrome Metabólico (SM) Hembra tratado con el extracto de tallo (GMS+EXT), al cual se le administró una dosis vía intragástrica de 300 mg/Kg de peso de ratón/día, durante un periodo de 30 días, el extracto fue suspendido en carboximetilcelulosa. Todos los grupos contaron con acceso a alimento y agua *ad libitum*.

Se pesaron cada semana los ratones y se realizaron las pruebas correspondientes a todos los grupos en los tiempos predeterminados.

## **6.7 Presión arterial**

La PA se evaluó en la semana 17 por medio de la técnica de tail-cuff (presión arterial indirecta), con el aparato IITC 5002 (Letica®) equipado con un microprocesador envuelto en un pequeño brazalete, el cual detecta la presión de la arteria caudal ubicada en la cola del ratón.

Los animales fueron ubicados dentro de un cepo acrílico el cual solo se expone la cola, la cual por convección mediante una cámara térmica se genera vasodilatación por un promedio de 5 minutos por ratón, ello permite una adecuada valoración de las presiones arteriales. Las evaluaciones se realizaron por triplicado para cada ratón, luego se promediaron los resultados obtenidos.

## **6.8 Curva de tolerancia a la glucosa**

Se realizó en la semana 17 después de un ayuno nocturno de 12 horas, se obtuvo de los ratones una muestra de sangre de la punta de la cola, para determinar glucemia en el glucómetro digital Accu-Chek. Posteriormente se administró 2 g/Kg de glucosa vía intragástrica, y se registró la glucemia en el tiempo cero, 30, 60, 90 y 120 minutos. Se utilizaron los promedios para realizar las gráficas que representaron la concentración de glucosa en el plasma contra el tiempo.

## **6.9 Pruebas Bioquímicas**

Se obtuvo sangre total (500µl) por punción retro orbital antes del sacrificio, la cual se centrifugó a 3500 rpm por 10 minutos y se separó el suero. Este fue almacenado a -20°C hasta su análisis. En las muestras de suero se determinaron niveles de colesterol total (CT), colesterol HDL y triglicéridos (TG) mediante los kits comerciales (RANDOX Laboratories LLD, # de lotes 373451, 359113).

Asimismo, se determinaron las concentraciones de las hormonas leptina e insulina a través de los kits comerciales Rat Lemptin 96-Well Plate Assay cat. # EZRL-83K y Rat Insulin 96-Well Plate Assay cat. #EZRM1-13K por el método ELISA. El cual está

basado en la técnica de sándwich directo. La interpolación de los resultados se realizó a través de una curva de referencia realizada en el mismo ensayo, empleando estándares de concentración conocida. La actividad enzimática se midió espectrofotométricamente.

## **6.10 Obtención y análisis de las muestras de tejido**

### **6.10.1 Medidas antropométricas**

El sacrificio se realizó por dislocación cervical, se tomaron medias de longitud desde el hocico hasta la región anal, y medidas de la cintura (parte baja del abdomen).

### **6.10.2 Obtención de grasa**

De los ratones hembras se extrajo la grasa retroperitoneal y perimetrial La cual se pesó y se calculó el porcentaje respecto al peso de cada ratón.

### **6.10.3 Ensayo de peroxidación**

El peso hepático se registró y se evaluó la peroxidación lipídica midiendo Malondialdehído (MDA), de acuerdo a la técnica propuesta por Meagher y Fitz, 2000, con algunas modificaciones. Una vez obtenido el hígado del ratón se lavó con solución salina al 0.09 %. Se homogenizaron 50 mg de hígado en 0,5 ml de tampón de fosfato frío (pH 7,0), en seguida se adicionó 800 µl de ácido tricloroacético (TCA), ácido tiobarbitúrico (TBA) y HCl (15% (p/v), 0,375% (p/v) y 0,25 N respectivamente. La muestra se llevó a ebullición durante 30 minutos en baño María. Después del enfriamiento, el precipitado floculante se separó por centrifugación a 5000 rpm durante 15 min. Se determinó la absorbancia de las muestras en espectrofotómetro a 532 nm.

## **6.11.- Análisis estadístico**

Para el análisis de los extractos de sólidos totales, fenoles totales, flavonoides, DPPH, FRAP, ABTS e inhibición enzimática. Los resultados se expresaron como la Media  $\pm$  DE. Se realizaron pruebas de análisis de varianza (ANOVA). Posterior al ANOVA se

efectuó la prueba de comparaciones post hoc de Fisher-LSD o la prueba de Dunnet. Se estableció un nivel de significancia de  $p < 0.05$ . El análisis estadístico se llevó a cabo en el programa STATISTICA v. 7 (OK, USA).

**Citotoxicidad.** - (CI50) se determinó a partir de una curva de concentración- respuesta (porcentaje de viabilidad) Los resultados se expresaron como la Media  $\pm$  DE.  $p < 0.05$ . GraphPad Prism® v. 7.0 software (CA, EE. UU.).

**Parámetros del SM.** - Los resultados se expresaron como media  $\pm$  EE,  $p < 0.05$  ANOVA de dos vías para los pesos de los ratones cada semana (6 semanas), así como la sobrecarga de glucosa cada 30 minutos durante 2h. Para las determinaciones puntuales en las que el tiempo no fue una variable independiente se empleó ANOVA de una vía, Post hoc Tukey, Holm-Sidak Sigma Plot v.12.

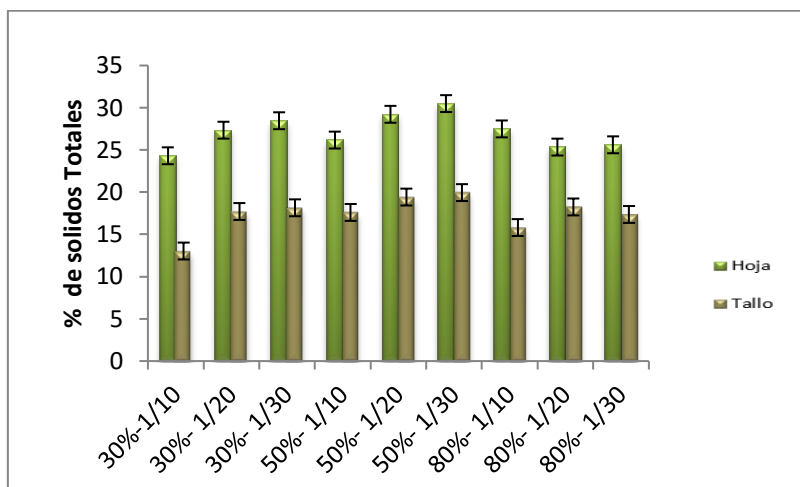
## 7. RESULTADOS

### 7.1 Extractos y rendimiento

#### 7.1.1 Evaluación de extractos

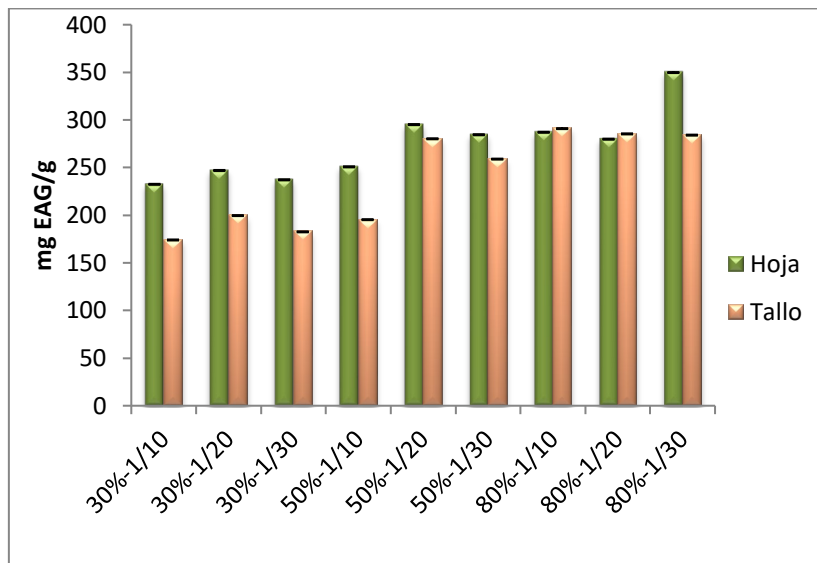
El objetivo del proceso fue obtener las mejores condiciones de extracción los cuales se estuvieron en función de: % de rendimiento de sólidos extraíbles, la caracterización fenólica (FT, FL,) y la actividad antioxidante (DPPH, ABTS, FRAP) de los extractos. En total se obtuvieron 18 extractos 9 de hojas y 9 de tallos, teniendo como resultado una matriz de diseño factorial 2x3x3.

El resultado de la concentración de etanol expresado en porcentaje gr extracto seco /gr muestra seca (p/p) \*100 y la relación M:S. Sobre la extracción de sólidos totales en las hojas y tallos del orégano se muestra en la Fig. 14. Aquí se puede observar que, tanto en la hoja como el tallo, la mayor cantidad de sólidos se obtuvo en la relación M:S 1/30 a la concentración del 50% etanol-agua, cuyos valores fueron de  $30.49 \pm 1.6$  y  $19.95 \pm 0.21$  en porcentaje para hoja y tallo respectivamente.



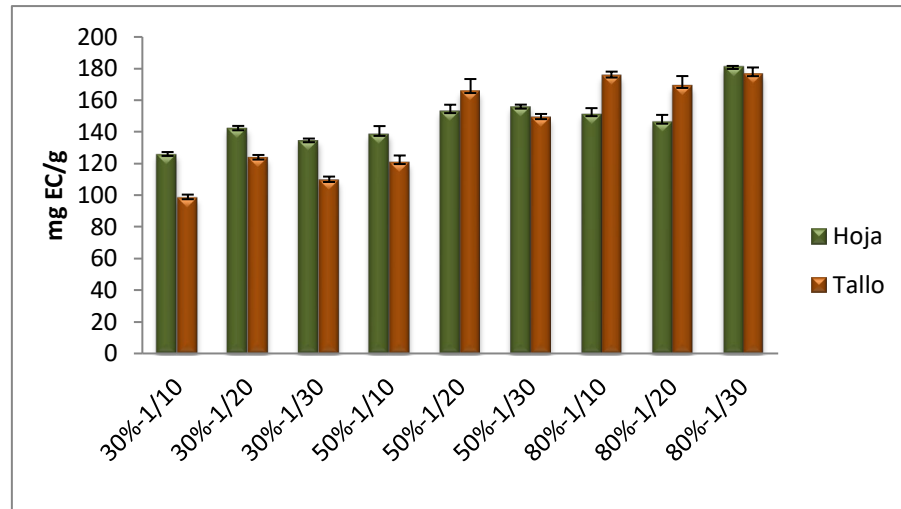
**Figura 14.-** Determinación del porcentaje de sólidos totales en extractos de hoja y tallo de orégano mexicano *Lippia graveolens*. Los porcentajes 30%, 50% y 80% corresponden a la concentración hidroalcohólica y 1/10, 1/20 y 1/30 a las relaciones M:S. Los valores representan la Media  $\pm$  DE (n=3).

En la Fig. 15. se puede observar que la mayor cantidad de fenoles totales en hoja se obtuvo en la relación M:S 1/30 a la concentración del 80% etanol-agua, con un valor de  $342.08 \pm 1.72$  mgEAG/g de extracto seco. En el tallo la mayor cantidad de fenoles totales se observó en la relación M:S 1/10 a la concentración del 80% etanol-agua, con un valor de  $277.92 \pm 8.80$  mgEAG/g de extracto seco.



**Figura 15.-** Contenido de fenoles totales (FT) de extractos en hoja y tallo de orégano mexicano *Lippia graveolens*. Los porcentajes 30%, 50% y 80% corresponden a la concentración hidroalcohólica y 1/10, 1/20 y 1/30 a las relaciones M:S los valores representan la Media  $\pm$  DE (n=3).

En la Fig. 16 se puede observar que la concentración de flavonoides (FL) más alta fue de  $180.76 \pm 0.92$  mgEC/g en la hoja y de  $176.19 \pm 4.52$  mgEC/g en el tallo a la concentración de 80% etanol-agua y relación M:S 1/30 para ambos extractos.



**Figura 16-** Contenido de flavonoides (FL) de extractos en hoja y tallo de orégano *Lippia graveolens*. Los porcentajes 30%, 50% y 80% corresponden a la concentración hidroalcohólica y 1/10, 1/20 y 1/30 a las relaciones M:S. Los valores representan la Media  $\pm$  DE (n=3).

se determinó trabajar con aquellas muestras que presentaron los valores más altos de polifenoles y flavonoides obtenidos de la relación M:S 1/30 y en las concentraciones de etanol-agua 30%, 50% y 80 %. Como se puede apreciar en el cuadro 5.



**Cuadro 5.-** Resultados de la determinación de % de sólidos totales, FT y FL

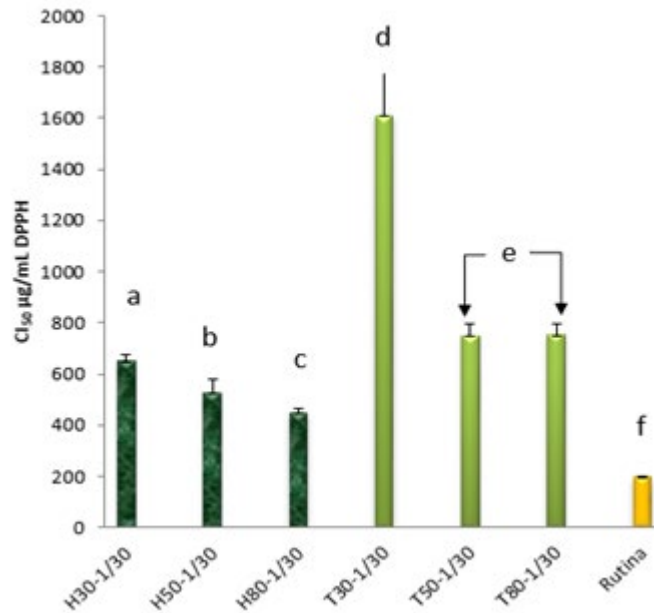
RELACIÓN %SOLVENTE Y M:S	Porcentaje de SÓLIDOS		FENOLES TOTALES (mgEAG/g)		FLAVONOIDES (mgEC/g)	
	HOJA	TALLO	HOJA	TALLO	HOJA	TALLO
30%-1/10	24.31±0.54 <sup>a</sup>	13.03±1.8 <sup>a</sup>	227.5±2.3 <sup>a</sup>	170.42±6.48 <sup>a</sup>	125.80±1.47 <sup>a</sup>	98.47±1.9 <sup>a</sup>
30%- 1/20	27.34± 0.29 <sup>b</sup>	17.71±0.39 <sup>b</sup>	241.67±17.6 <sup>b</sup>	195.42±6.48 <sup>b</sup>	132±1.78 <sup>b</sup>	103.52±1.9 <sup>b</sup>
<b>30%- 1/30</b>	<b>28.46±0.31<sup>b</sup></b>	<b>18.15±0.34<sup>b</sup></b>	<b>232.08±13.5<sup>b</sup></b>	<b>178.75±8.8<sup>a</sup></b>	<b>134.47±1.32<sup>c</sup></b>	<b>109.33±2.43<sup>c</sup></b>
50%- 1/10	26.17±1.2 <sup>b</sup>	17.6±0.49 <sup>b</sup>	245.42±11.2 <sup>b</sup>	191.25±6.4 <sup>b</sup>	138.47±5.19 <sup>c</sup>	120.66±4.43 <sup>b</sup>
50%- 1/20	29.22±0.72 <sup>c</sup>	19.42±0.34 <sup>c</sup>	288.75±10.0 <sup>c</sup>	274.17±12.9 <sup>c</sup>	152.85±4.31 <sup>d</sup>	165.52±7.8 <sup>d</sup>
<b>50%- 1/30</b>	<b>30.49±1.6<sup>c</sup></b>	<b>19.95±0.21<sup>c</sup></b>	<b>278.33±12.9<sup>c</sup></b>	<b>253.33±7.07<sup>d</sup></b>	<b>155.71±1.51<sup>d</sup></b>	<b>149.04±2.29<sup>e</sup></b>
80%- 1/10	27.49±2.6 <sup>b</sup>	15.81±0.72 <sup>d</sup>	280.83±15.3 <sup>c</sup>	273.58±13.5 <sup>c</sup>	150.95±4.06 <sup>d</sup>	175.33±2.75 <sup>f</sup>
80%- 1/20	25.34±0.7 <sup>a</sup>	18.25±0.46 <sup>b</sup>	273.75±14.7 <sup>c</sup>	279.17±12.03 <sup>c</sup>	146.19±4.56 <sup>d</sup>	168.76±6.52 <sup>f</sup>
<b>80%- 1/30</b>	<b>25.61±0.4<sup>a</sup></b>	<b>17.36±3.2<sup>b</sup></b>	<b>342.08±1.7<sup>d</sup></b>	<b>277.92±8.8<sup>c</sup></b>	<b>180.76±0.92<sup>e</sup></b>	<b>176.19±4.52<sup>f</sup></b>

Los valores representan la media ± DE (n=3), superíndices por columnas representan diferencia significativa  $p < 0.05$  entre los extractos con distinta relación M:S y % de alcohol. ANOVA de una vía post hoc Fisher-LSD.

### 7.1.2 Evaluación antioxidante *in vitro*

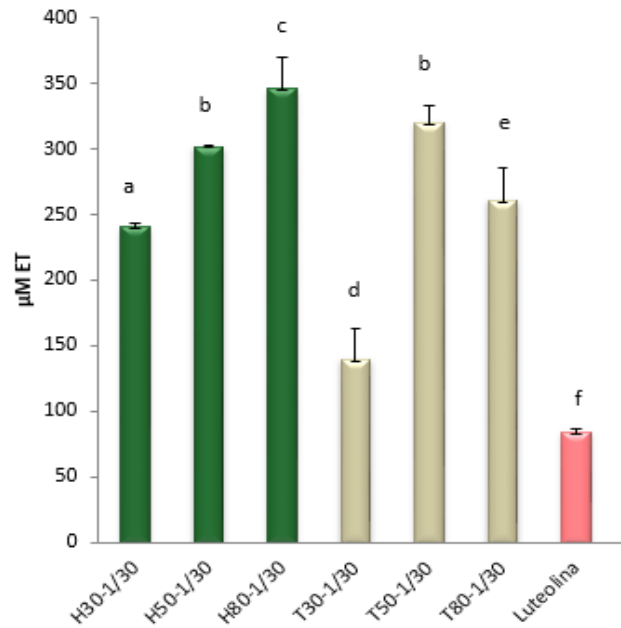
Con respecto a la capacidad antioxidante que presentan los extractos, en la evaluación con el radical DPPH, los extractos de hojas tuvieron mayor inhibición con respecto a los de tallos. En la Fig.17 se muestran los resultados como concentración efectiva 50 (CI<sub>50</sub>), que corresponde a la concentración de extracto para inhibir el 50% del radical resultando la mayor actividad inhibitoria a menor concentración del extracto (µg/ml). Por lo tanto, la mayor actividad inhibitoria se observó con la hoja en la concentración 80% etanol-agua con un valor 447.6±15.053 ug/ml. En el tallo la mayor actividad de

inhibición fue en la concentración 50% y 80% de solvente etanol-agua con un valor de  $748.51 \pm 48.8$   $\mu\text{g/ml}$ , utilizando como estándar de referencia Rutina.



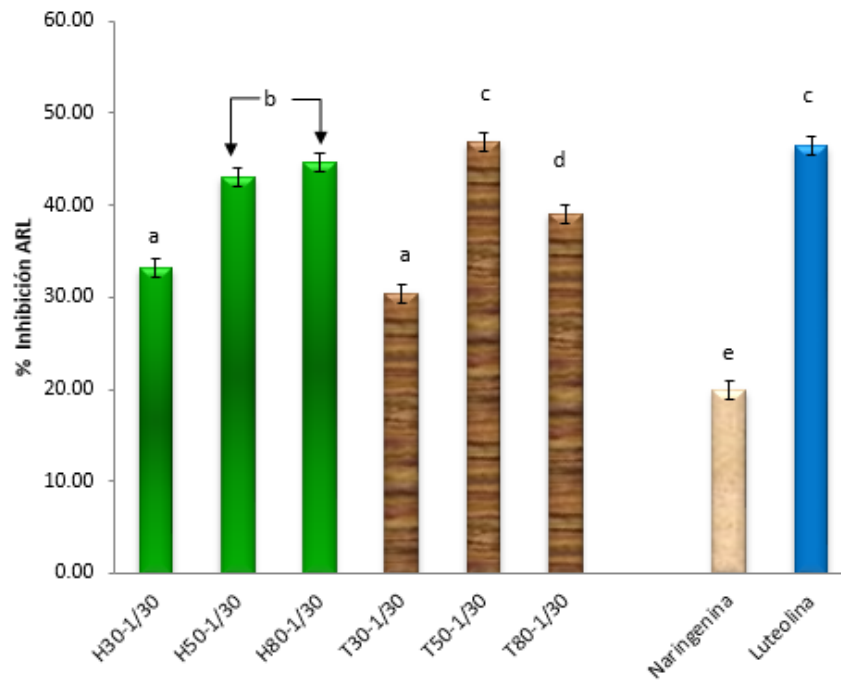
**Figura 17.-** Relación de la  $CI_{50}$  del efecto del DPPH en hoja y tallo de extractos hidroetanólicos de orégano *Lippia graveolens*. Los valores representan la Media  $\pm$  DE (n=3), Letras diferentes indican diferencia estadística significativa entre grupos  $p < 0.05$  ANOVA de una vía post hoc Tukey.

La capacidad antioxidante de FRAP (Poder Antioxidante Reductor del Hierro), se muestra en la Fig. 18, los mejores resultados fueron para la hoja, H80 con un valor de  $346.09 \pm 24.4$  mmoles/ml equivalentes de Trolox ( $\mu\text{M ET}$ ) y para tallo T50 con un valor de  $320.18 \pm 13.49$   $\mu\text{M ET}$  utilizando como referencia estándar la Luteolína, quien presentó la menor inhibición con respecto a los extractos.



**Figura 18.-** Evaluación antioxidante *in vitro* mediante la técnica FRAP de extractos hidroetanólicos de hoja y tallo de orégano *Lippia graveolens*. Los valores representan la Media  $\pm$  DE (n=3), letras diferentes indican diferencia estadística significativa entre grupo  $p < 0.05$  ANOVA de una vía post hoc Tukey.

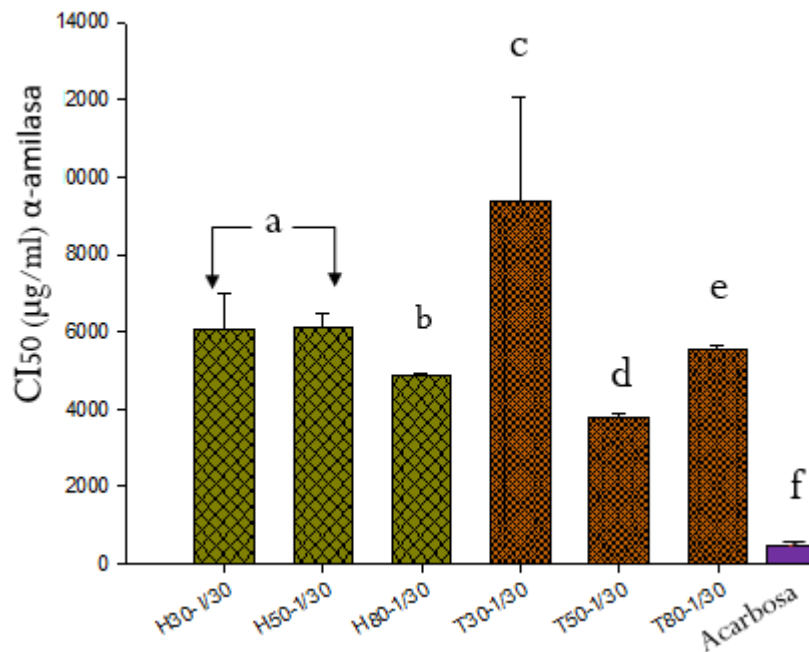
En la Fig.19 se muestra el resultado de la evaluación antioxidante mediante la técnica ABTS, los resultados se expresaron como porcentaje de inhibición, por lo que a mayor porcentaje la capacidad inhibitoria es mejor, resultando los mayores valores para hoja T80 con un valor de  $44.33 \pm 0.71$  en % de inhibición (%ARL) y para el tallo T50 el cual fue superior a la hoja, el valor fue de  $46.77 \pm 1.65$  (%ARL) y sin mostrar diferencias significativas el T50  $p > 0.05$  con respecto al estándar Luteolína, cuyo valor fue  $46.36 \pm 0.73$ .



**Figura 19.-** Evaluación antioxidante *in vitro* mediante la técnica ABTS de extractos hidroetanólicos de hoja y tallo de orégano *Lippia graveolens*. Los valores representan la Media  $\pm$  DE (n=3) indican diferencia significativa entre grupos  $p < 0.05$  ANOVA de una vía post hoc Tukey.

## 7.2 Evaluación de la inhibición $CI_{50}$ de la enzima $\alpha$ -amilasa

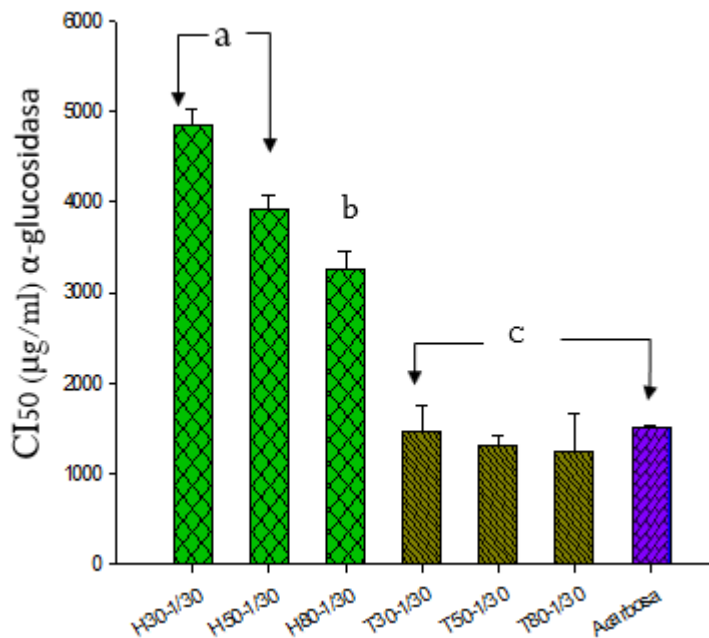
En la Fig. 20 se muestra que el tallo T50 tuvo mayor actividad inhibitoria en la enzima  $\alpha$ -amilasa con un valor de  $3804.62 \pm 48.37 \mu\text{g/ml}$ , con respecto a la hoja H80 con un valor de  $4868 \pm 41.10 \mu\text{g/ml}$ , siendo el control acarbossa el que presentó la mayor actividad inhibitoria en la enzima  $\alpha$ -amilasa con un valor de  $189.29 \pm 4.28 \mu\text{g/ml}$ .



**Figura 20.** Determinación de la CI<sub>50</sub> para inhibir la enzima  $\alpha$ -amilasa *in vitro* en los extractos hidroetanólicos de hoja y tallo de orégano *Lippia graveolens*. Los valores representan la Media  $\pm$  DE (n=3), letras diferentes indican diferencia significativa entre grupos  $p < 0.05$  ANOVA de una vía post hoc Tukey.

### 7.3 Evaluación de la inhibición CI<sub>50</sub> de la enzima $\alpha$ -glucosidasa

En la Fig. 21 se muestra que el tallo presentó actividad inhibitoria CI<sub>50</sub> en la enzima  $\alpha$ -glucosidasa con los valores de T30 de  $1368.84 \pm 40.45$   $\mu\text{g/ml}$ ; T50 de  $1337.69 \pm 88.37$   $\mu\text{g/ml}$ ; T80 de  $1420.35 \pm 88.37$   $\mu\text{g/ml}$  y el control acarbosa con el valor de  $1401.35 \pm 19.06$   $\mu\text{g/ml}$  sin diferencias significativa  $p > 0.05$ , entre ellos, siendo la hoja H80 la que presentó menor actividad inhibitoria en la enzima  $\alpha$ -glucosidasa con un valor de  $3264.71$   $\mu\text{g/ml}$ .



**Figura 21-** Determinación de la CI<sub>50</sub> de la  $\alpha$ -glucosidasa de los extractos hidroetanólicos de hoja y tallo de orégano mexicano *Lippia graveolens*. Los valores representan la Media  $\pm$  DE n=3, letras diferentes indican diferencia significativa entre grupos  $p < 0.05$  ANOVA de una vía post hoc Tukey.

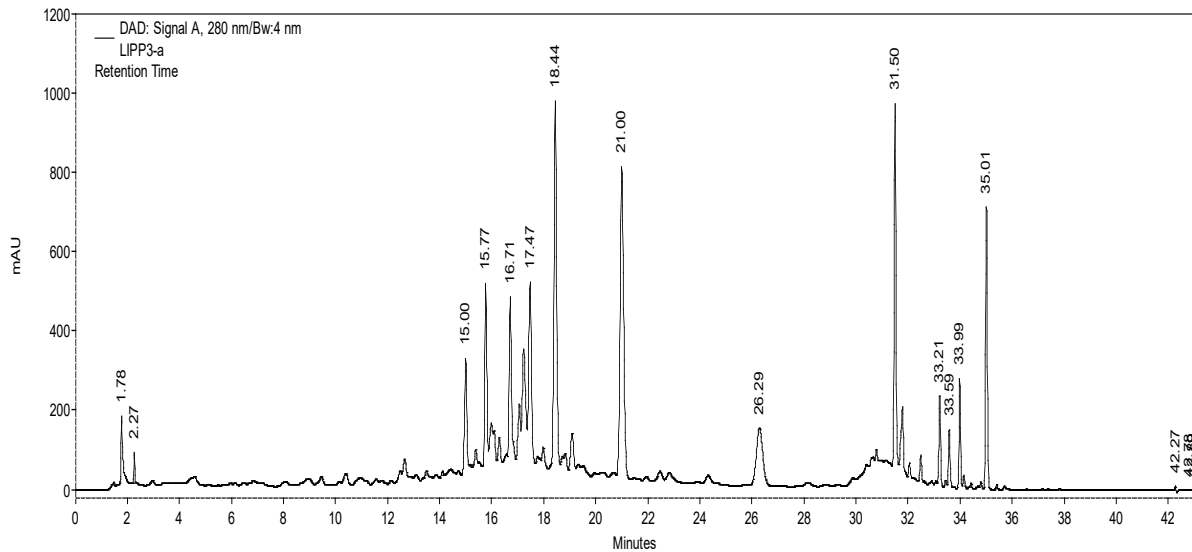
## 7.4 Identificación de metabolitos mediante cromatografía

### 7.4.1 Comparación cualitativa de los compuestos fenólicos por HPLC-DAD

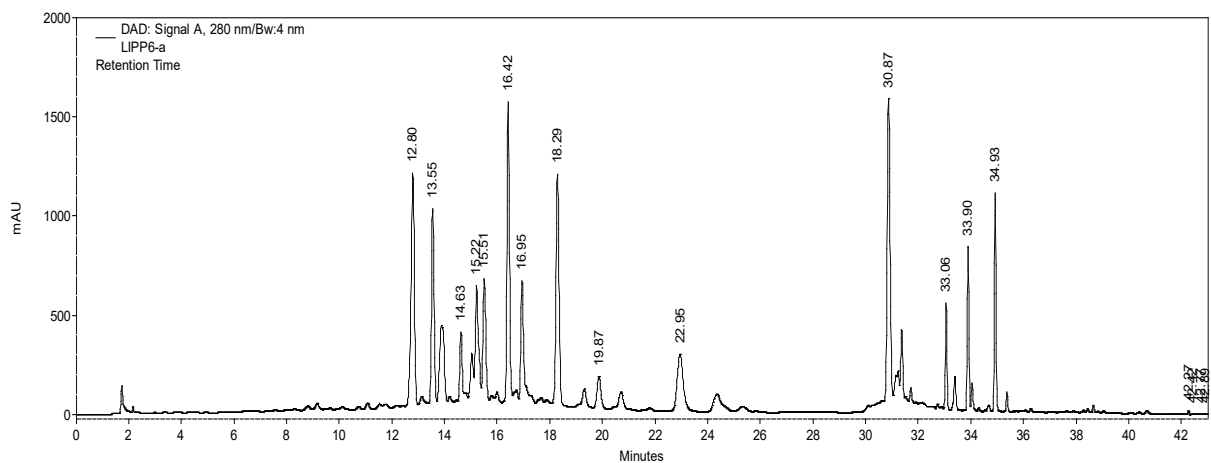
Los resultados del análisis de conglomerados para definir la semejanza de los compuestos extraídos con las diferentes concentraciones de etanol, ET30, ET50 y ET80, tanto en hojas como en tallos se muestran en la Figura 22.

Los resultados de esta evaluación mostraron que en las hojas los compuestos que se solubilizaron con ET50 son los mismos que se disolvieron en ET80, de forma cualitativa y en el caso de los tallos la semejanza entre los solubles en ET50 y ET80 es del 95%. Para los extractos de tallos ET30, la semejanza con el resto es del 70%, mientras que en las hojas ET30 la semejanza es menor al 30%.

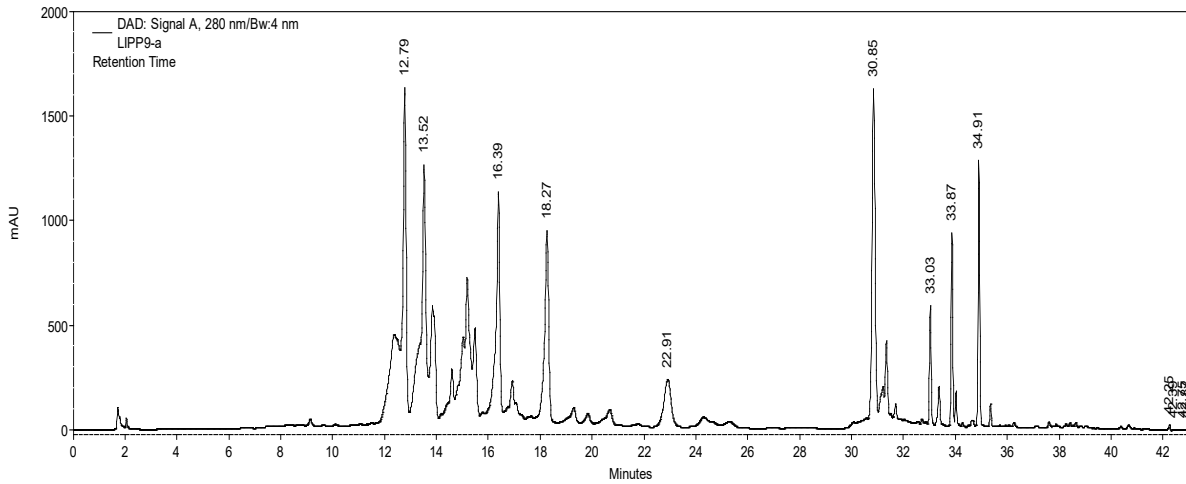
De esta información se deduce que la concentración del solvente ET50 y ET80 no afectó de forma cualitativa la solubilidad de los compuestos, aunque si de manera cuantitativa, con respecto al ET30.



a) Cromatograma de extracto de Hoja ET30

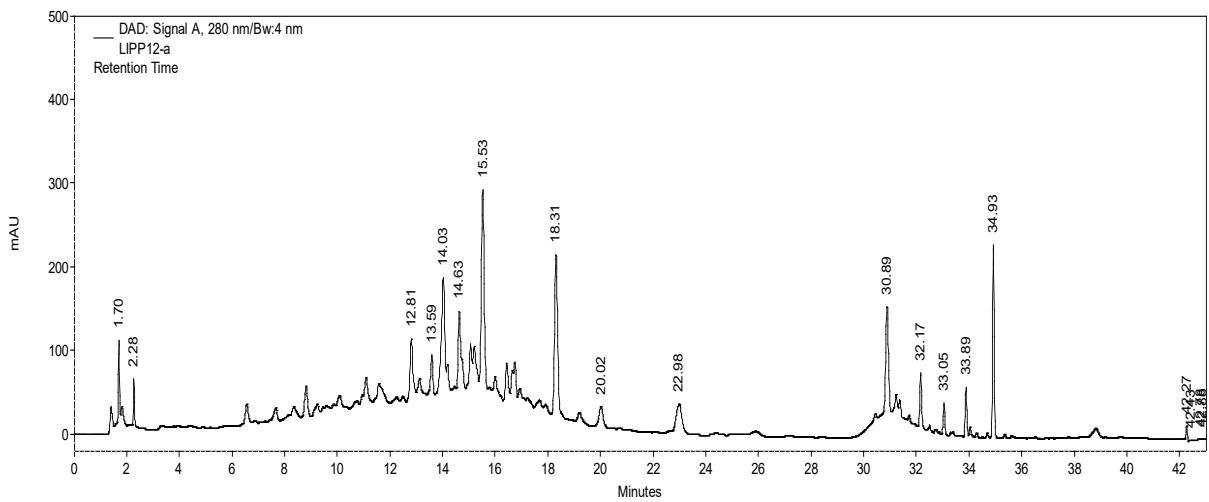


b) Cromatograma de extracto de Hoja ET50



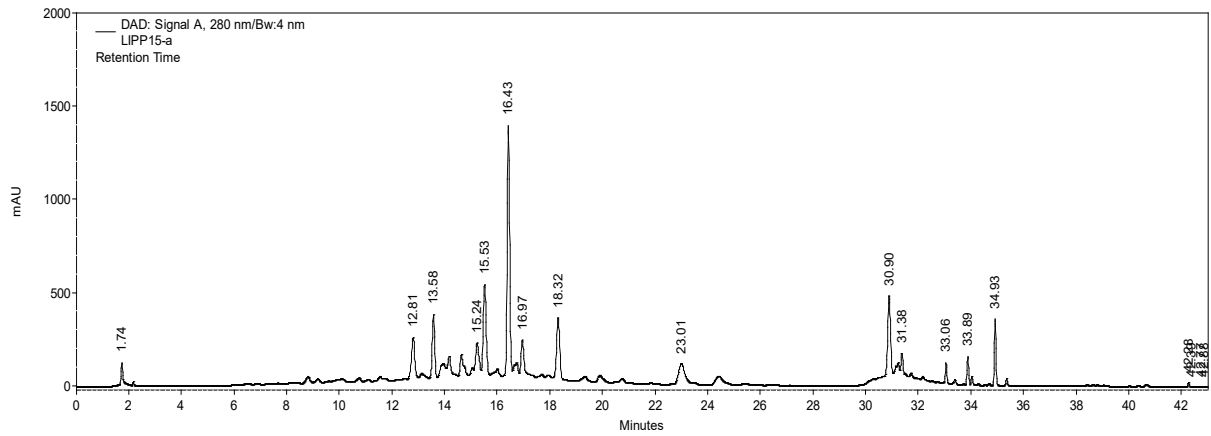
c) Cromatograma de extracto de Hoja ET80

**Figura 22.-** Cromatogramas (HPLC-DAD) a 280 nm de extractos de hojas de orégano mexicano a diferentes concentraciones de etanol, a) ET30, b) ET50, c) ET80.

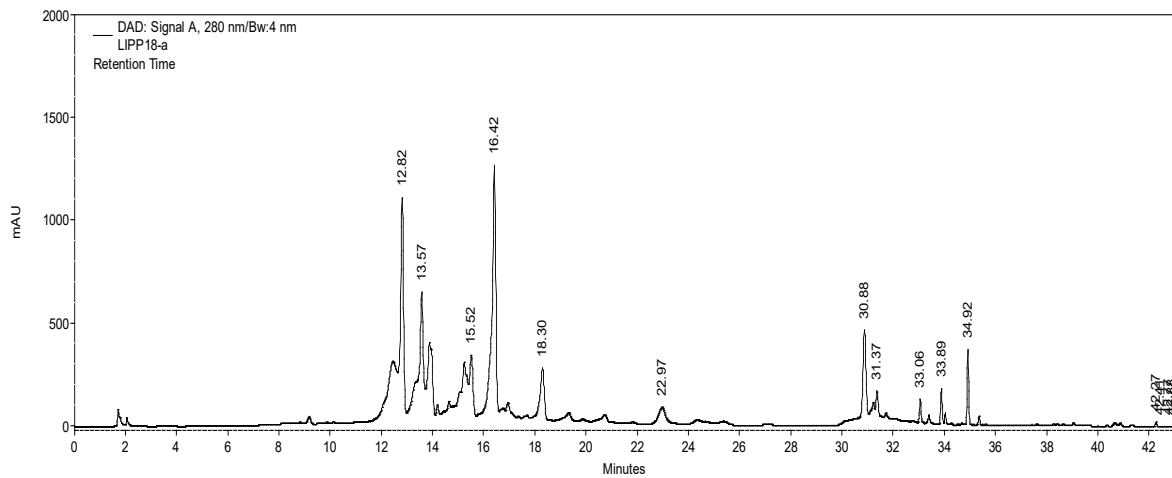


a) Cromatograma de extracto Tallo ET30.





b) Cromatograma de extracto de Tallo ET50.

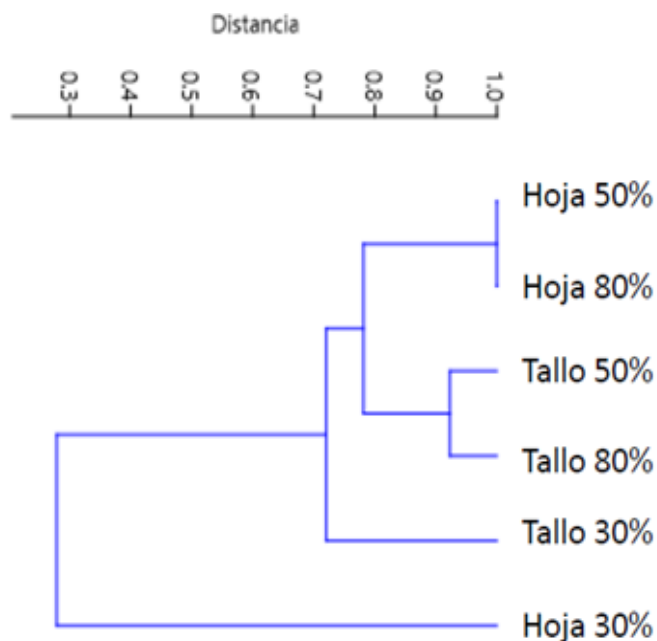


c) Cromatograma de extracto de Tallo ET80.

**Figura 23.-** Cromatogramas (HPLC-DAD) a 280 nm de extractos de tallo de orégano mexicano a diferentes concentraciones de etanol, a) ET30, b) ET50, c) ET80.

En la siguiente fig. 24 se realizó un algoritmo, sobre la relación que pueden guardar los distintos cromatogramas con respecto a la concentración de solvente, dando los siguientes resultados, en los cuales se puede apreciar la semejanza y diferencias entre los cromatogramas los compuestos ET30, ET50 y ET80, tanto de hoja como de tallo, este análisis indica que las hojas ET50 y ET80 son cromatográficamente iguales, de forma cualitativa, mientras que en tallo ET50 y ET80 la semejanza es del 95%. El tallo

ET30 y principalmente la hoja ET30 son cromatográficamente diferentes al resto de las demás muestras.



**Figura 24.-** Análisis de conglomerados mediante el algoritmo UPGMA y el índice de Jaccard utilizando el programa PAST versión 3.21(Hammer, Harper & Ryan 2001). generado a partir de presencia (1), ausencia (0) de compuestos (picos cromatográficos) a diferentes tiempos de retención.

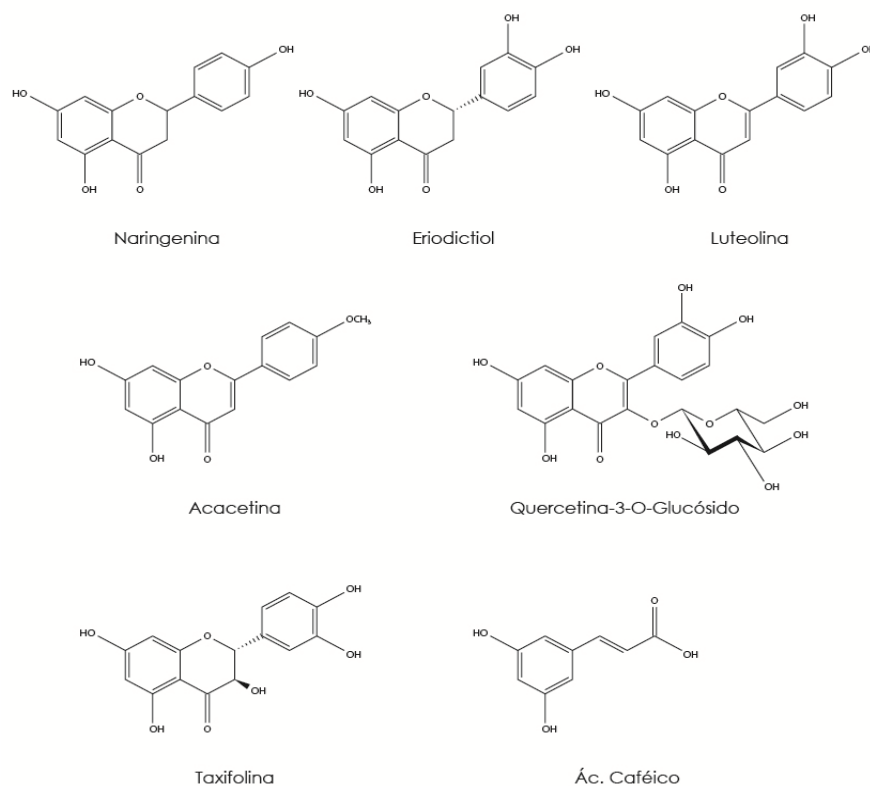
#### 7.4.2 Compuestos identificados por UPLC- ESI-MS

De acuerdo a los tiempos de retención y a los espectros identificados de las moléculas conforme a los picos eludidos utilizando estándares de referencia se reportan las siguientes moléculas (cuadro 6), así mismo se muestran algunas estructuras moleculares de los polifenoles reportados, Fig. 25.

Los resultados de los compuestos identificados y la concentración expresada en porcentajes, en hoja residual y tallos, se presentan en el Cuadro 6.

**Cuadro 6.-** Algunos polifenoles identificados en los extractos de hoja y tallo del orégano mexicano, relación 1:30. Los resultados se expresaron en porcentaje de área relativa de extractos identificados por UPLC-DAD-MS.

<b>Rt (min)</b>	<b>[M-H]<sup>-</sup></b>	<b>HOJA (%)</b>	<b>TALLO (%)</b>	<b>Identificación</b>
4.32	179	14.67	7.34	<b>Ácido cafeico</b>
5.80	463	3.59	2.82	<b>Quercetina-3-O-glucosido</b>
6.35	609	0.32	0.35	<b>Rutina</b>
6.41	303	17.61	21.31	<b>Taxifolina</b>
7.56	137	2.01	2.86	<b>Acido 2-hydroxybenzoico</b>
7.79	435	1.00	0.90	<b>Phloridzina</b>
8.67	287	15.13	20.59	<b>Eriodictyol</b>
8.92	285	4.43	6.12	<b>Luteolina</b>
8.96	301	0.80	0.96	<b>Quercetina</b>
9.73	271	25.95	30.11	<b>Naringenina</b>
9.84	269	1.53	2.18	<b>Apigenina</b>
12.51	283	10.44	0.94	<b>Acacetina</b>



**Figura 25.-** Algunas estructuras moleculares identificadas en extractos de hoja y tallo del orégano mexicano, *Lippia graveolens*.

## 7.6 Evaluación toxicológica

### 7.6.1 Toxicidad aguda DL<sub>50</sub> con extractos hidroetanólicos de hoja y tallo de *Lippia graveolens* en modelo murino

Después de la administración de los extractos de hoja y tallo, a ratones hembras y machos, y transcurridos 14 días de observación no se presentaron síntomas, ni cambios en las conductas de los animales ni muertes.

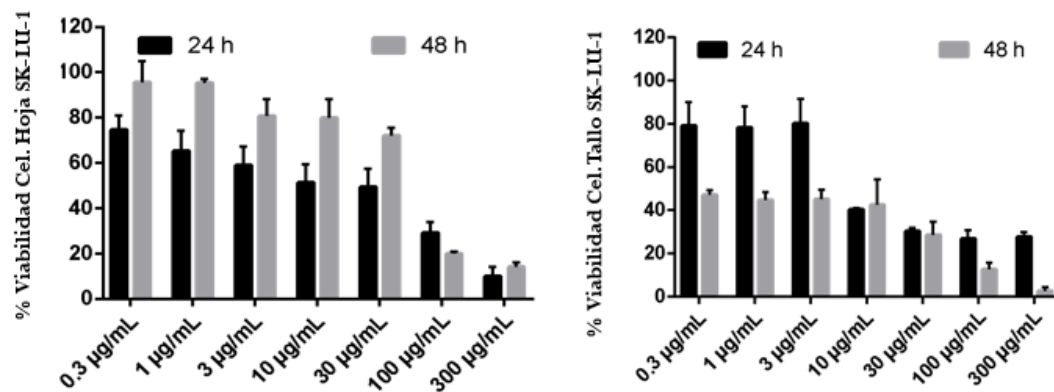
La DL<sub>50</sub> de los extractos de hoja y tallo del orégano mexicano *Lippia graveolens* está dentro de la categoría 5 de acuerdo a la OECD-423 donde la DL<sub>50</sub> es superior al valor de 2000 mg/Kg. Por lo tanto, los extractos son considerados no tóxicos.

### 7.6.2 Evaluación citotóxica por la técnica MTT

El efecto citotóxico de los extractos de hoja y tallo en células SK-LU-1, se muestran en la Figura 26, como promedio de tres experimentos independientes. Ambos extractos disminuyeron la viabilidad celular en la línea SK-LU-1.

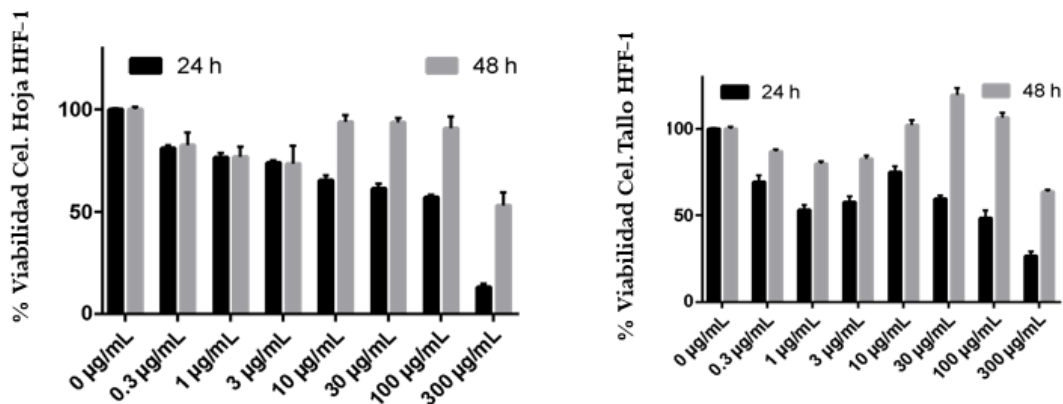
En comparación con el control negativo el control vehículo (DMSO 0,1%) no disminuyó el porcentaje de viabilidad celular ( $116,49 \pm 7,88\%$ ). El control positivo cisplatino (5  $\mu\text{g/ml}$ ) redujo la viabilidad celular a  $60,02 \pm 4,10 \%$  y  $24,80 \pm 1,77 \%$  a 24 h y 48 h, respectivamente.

Las concentraciones inhibitorias  $CI_{50}$  del extracto de hoja fueron  $14,57 \pm 1,33 \mu\text{g/ml}$  y  $41,69 \pm 1,15 \mu\text{g/ml}$  a 24 h y 48 h respectivamente. Para el extracto de Tallo los valores fueron  $7,80 \pm 1,32 \mu\text{g/ml}$  y  $0,81 \pm 0,28 \mu\text{g/ml}$ , a 24 h y 48 h respectivamente. Lo anterior demostró que el extracto de tallo presentó un mayor efecto citotóxico sobre la línea celular de cáncer de pulmón de células no pequeñas en comparación con el extracto de hoja. (Fig. 26).



**Figura 26.-** Viabilidad celular en la línea SK-LU-1 después de la exposición a diferentes concentraciones de extractos de Hoja y Tallo a las 24h y 48 h de *Lippia graveolens*. Media  $\pm$ DE (n=3).

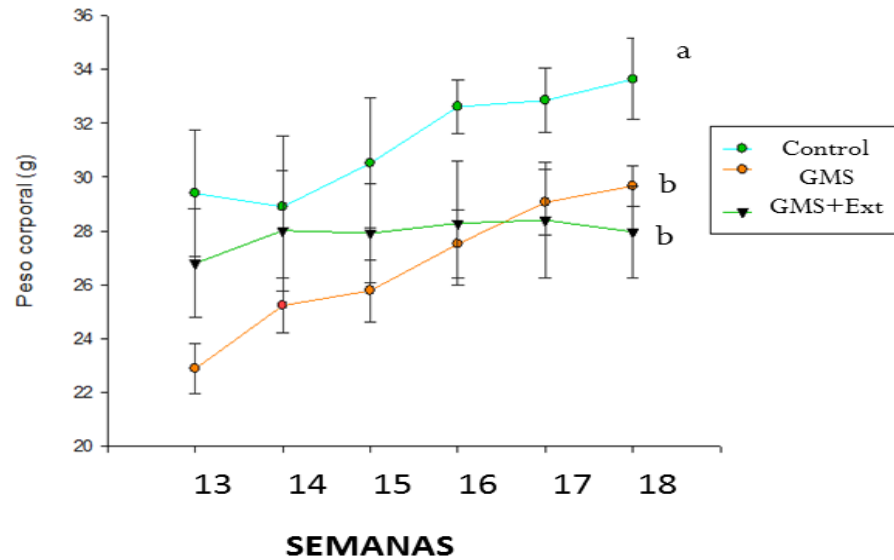
El efecto citotóxico de los extractos de Hoja y tallo sobre la línea celular normal HFF-1, se muestran en la Figura 27, como promedio de tres experimentos independientes. Los valores  $CI_{50}$  para el extracto de Hoja fueron  $59,86 \pm 1,22 \mu\text{g/ml}$  y  $>300 \mu\text{g/ml}$ , a las 24 h y 48 h, respectivamente, para el extracto de Tallo los valores  $CI_{50}$  fueron  $50,77 \pm 1,37 \mu\text{g/ml}$  y  $>300 \mu\text{g/m}$ , a 24 h y 48 h respectivamente. En cuanto al Índice de Selectividad, el extracto de tallo fue más selectivo que el extracto de Hoja, con 4.1 y 6.5 respectivamente.



**Figura 27.-** Viabilidad celular en la línea HFF-1 después de la exposición a diferentes concentraciones de extractos de Hoja y Tallo a las 24h y 48 h de *Lippia graveolens*. Media  $\pm$ DE (n=3).

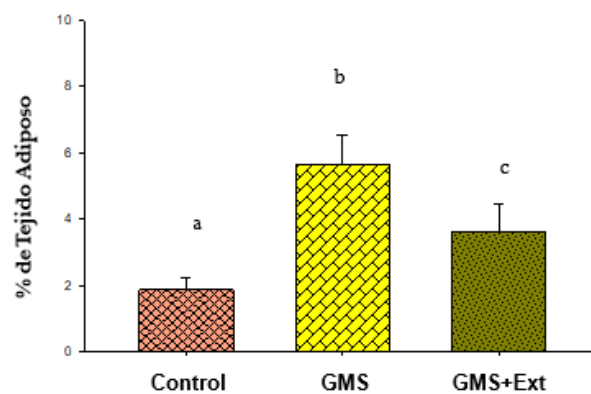
### 7.7 Pesos de los ratones hembras.

A partir de la semana 13 hasta la semana 18 se registraron los pesos que se muestran en la siguiente Fig.28, en donde se puede apreciar un incremento constante tanto para el grupo control como para el grupo GMS, y se mantuvo muy estable el grupo GMS+Ext. Aunque no hubo diferencias significativas entre los grupos GMS y GMS+Ext.



**Figura 28.-** Peso corporal de los ratones hembra con diferentes tratamientos. ( $n=6$ ). Media  $\pm$  EE, letras diferentes indican diferencia significativa  $p<0.05$  ANOVA de dos vías, post- hoc Tukey.

En la Fig. 29 se muestran los resultados obtenidos de la grasa peritoneal y perimetral de los ratones hembras, en donde se puede apreciar que hay diferencias significativas entre los tres grupos. Siendo el grupo GMS del que se obtuvo mayor porcentaje de grasa.



**Figura 29.-** Porcentaje de grasa corporal, Media  $\pm$  EE ( $n=6$ ), Letras diferentes representan diferencia significativa entre grupos  $p< 0.05$  ANOVA de una vía post hoc Holm-Sidak.

En el cuadro 7, se muestran los resultados de los pesos de la semana 18 y de las medidas antropométricas obtenidas el mismo día después del sacrificio, en donde se puede observar que no hay diferencias significativas entre el grupo GMS y el grupo GMS+Ext, con respecto al peso, en cuanto a la longitud (hocico-ano) hay diferencias significativas en los tres grupos siendo el de menor crecimiento el grupo GMS, con respecto a la medida de la cintura el grupo que presentó la mayor cintura fue el grupo GMS con respecto al grupo control y GMS+Ext, en donde en estos últimos grupos no se presentaron diferencias significativas entre ellos.

**Cuadro 7.-** Medidas antropométricas de los ratones hembra CD1.

Medidas (Semana 18)	Control	GMS	GMS+Ext
peso (g)	34.78 ±1.12 <sup>a</sup>	29.35±1.35 <sup>b</sup>	27.48±1.51 <sup>b</sup>
Longitud Ca-Co (cm)	10.13±0.22 <sup>a</sup>	9.15±0.14 <sup>b</sup>	9.52±0.26 <sup>c</sup>
Cintura (cm)	4.03±0.11 <sup>a</sup>	4.40±0.16 <sup>b</sup>	4.05±0.12 <sup>a</sup>

Los valores representan la Media ± EE (n=6), superíndices, representan diferencia significativa por fila entre grupos  $p < 0.05$ . ANOVA de una vía post hoc Holm-Sidak.

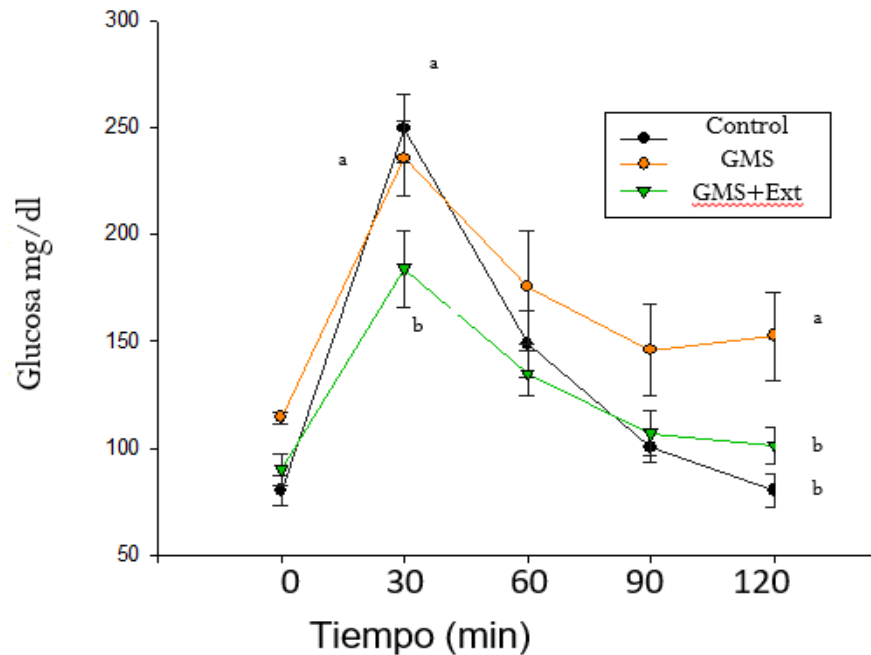
## 7.8 Efecto de los extractos sobre marcadores

### 7.8.1 Actividad hipoglucemiante

Los resultados de la curva de tolerancia a la glucosa en cada grupo experimental se muestran en la siguiente Fig.30 en donde se puede apreciar que entre los grupos Control y GMS no hay diferencias significativas en el tiempo 30 minutos, pero si hay diferencia significativa entre estos dos grupos y grupo GMS+EXT, y en el minuto 120

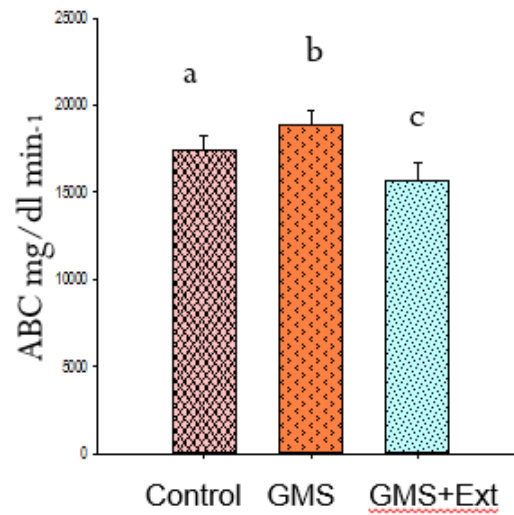


no presentaron diferencias significativas los grupos GMS y GMS+EXT.pero si estos dos grupos con respecto al control.



**Figura 30.-** Curva de tolerancia a la glucosa en ratones hembra de extractos de tallo de *Lippia graveolans* Media  $\pm$ EE (n=6), Letras diferentes representan diferencia significativa a los tiempos 30min y 120 min  $p < 0.05$ , ANOVA de dos vias, Post hoc Holman –Sirak.

Para clarificar los resultados de la curva de tolerancia a la glucosa, y observar las diferencias significativas entre grupos se determinó el área bajo la curva de cada grupo, como se puede observar en la siguiente Fig.31 en donde se puede apreciar que hay diferencias significativas entre los tres grupos siendo el grupo GMS+EXT ( $15,645.32 \pm 115.42 \text{ mg/dl min}^{-1}$ ) el que obtuvo el menor valor con respecto a los otros dos grupos, Control ( $17,362.51 \pm 108.69 \text{ mg/dl min}^{-1}$ ) y GMS ( $18,825.00 \pm 109.33 \text{ mg/dl min}^{-1}$ ).



**Figura 31.-** Área bajo la curva de tolerancia a la glucosa en ratones hembra, los valores representan la Media  $\pm$  EE (n=6). Letras diferentes representan diferencia significativa  $p < 0.05$  ANOVA de una vía. Pos hoc Holman–Sirak.

### 7.8.2. Evaluación de presión arterial, colesterol, triglicéridos, cHDL, lipoperoxidación, hormonas insulina y leptina.

Los resultados que se muestran en el cuadro 8 indican respecto a la presión sistólica y diastólica que no hubo diferencias significativas entre el grupo Control y el grupo GMS+EXT, pero sí de estos dos grupos con respecto al grupo GMS el cual presentó una mayor presión arterial. Con respecto a los valores de colesterol, triglicéridos y cHDL colesterol, el comportamiento fue el mismo que con los resultados de la presión arterial, no hubo diferencias significativas entre los grupos Control y GMS+EXT pero si obtuvo mayores valores el grupo GMS, con respecto a los valores de lipoperoxidación no hubo diferencias significativas entre el grupo GMS y GMS+EXT, pero sí de estos con respecto al grupo Control, para la cuantificación de las hormonas Insulina y Leptina el grupo hubo diferencias significativas entre los tres grupos presentando un mayor valor el grupo GMS.

**Cuadro 8.** Valores de marcadores en ratones hembra CD1.

<b>PARÁMETRO</b>	<b>Control</b>	<b>GMS</b>	<b>GMS + Ext</b>
<b>Presión Sistólica</b> (mm Hg)	162.7±5.51 <sup>a</sup>	176.0±3.77 <sup>b</sup>	158.66±2.10 <sup>a</sup>
<b>Presión Diastólica</b> (mm Hg)	145.61±5.65 <sup>a</sup>	164.44±3.04 <sup>b</sup>	145.83±2.91 <sup>a</sup>
<b>Colesterol</b> (mg/dl)	89.24±3.59 <sup>a</sup>	120.27±9.80 <sup>b</sup>	85.84±6.83 <sup>a</sup>
<b>Triglicéridos</b> (mg/dl)	121.0±8.76 <sup>a</sup>	185±3.59 <sup>b</sup>	123.4±9.80 <sup>a</sup>
<b>cHDL colesterol</b> (mg/dl)	51.80±14.11 <sup>a</sup>	33.70±2.43 <sup>b</sup>	56.5±2.22 <sup>a</sup>
<b>Lipoperoxidación</b> mMMDA/mg de hígado	8.10±1.94 <sup>a</sup>	16.25±2.6 <sup>b</sup>	13.35±1.39 <sup>b</sup>
<b>Hormona Insulina</b> (µg/ml)	0.12±0.001 <sup>a</sup>	0.29±0.008 <sup>b</sup>	0.17±0.004 <sup>c</sup>
<b>Hormona Leptina</b> (µg/ml)	3.05±0.03 <sup>a</sup>	24.80±0.08 <sup>b</sup>	5.07±0.05 <sup>c</sup>

Los valores representan la Media ± EE (n=6), superíndices, representan diferencia significativa por fila  $p < 0.05$  ANOVA de una vía post hoc Holman–Sirak.

## 8. DISCUSIÓN

El propósito de este estudio fue evaluar en residuos de hoja y tallo del orégano mexicano, sin ningún valor comercial aparente, la presencia de polifenoles, se observó que el tallo tuvo una mayor actividad inhibitoria en las enzimas  $\alpha$ -amilasa y  $\alpha$ -glucosidasa; siendo este extracto el que se utilizó para evaluar su efecto en modelo murino con SM.

### 8.1 Evaluación de extractos

En la evaluación del efecto del solvente y la relación masa:solvente (M:S) sobre la extracción de compuestos bioactivos de la hoja y del tallo de orégano de la especie *Lippia graveolens*, se encontró que la concentración del solvente es el parámetro con mayor efecto en la extracción de metabolitos que en este caso fue etanol-agua al 80% (ET80). Do *et al.* 2014 determinaron que la extracción de fenoles con distintos solventes y métodos de extracción se incrementa con el aumento del contenido de agua, lo que puede deberse a la polaridad y solubilidad que presentan los compuestos de la muestra.

En la hoja y tallo la relación M:S 1/30, fue la de los mejores rendimientos solo la relación 1/10 presentó diferencia con el resto a las otras dos relaciones (1/20 y 1/30), por lo que se reconoce que el rendimiento de extracción de compuestos fenólicos de diversos materiales se debe al efecto de las variables de proceso ensayadas sobre el sistema de extracción a través de los diversos fenómenos involucrados en ésta, tales como: la naturaleza del compuesto extraíble, estructura química y su relación con la polaridad del solvente utilizado en la extracción (Mosquera *et al.*, 2015), estabilidad y/o degradación de compuestos activos, difusión interna y externa, solubilización y selectividad de los compuestos fenólicos, así como sobre los fenómenos de adhesión líquido/sólido; cuyos efectos combinados determinan la concentración final de los compuestos fenólicos presentes en los extractos así como su capacidad antioxidante,

como lo reportado por Flores *et al.*, 2017, quienes trabajaron con hoja entera de orégano mexicano a diferentes concentraciones de etanol en la extracción.

Con respecto a la actividad antioxidante que presentaron los extractos, en la evaluación con el radical DPPH, los extractos de hoja tuvieron mayor inhibición con respecto a los de tallo (Fig.17), en la cual se muestran los resultados como concentración inhibitoria 50 (CI<sub>50</sub>), que corresponde a la concentración de extracto para inhibir el 50% del radical, a menor concentración del extracto (mg/l) indica que la actividad es mayor. Estos valores tienen cierta similitud con lo reportado por Gutiérrez *et al.*, 2019, quienes midieron esta actividad antioxidante en hoja entera de orégano reportada como porcentaje de inhibición. En este trabajo los mayores efectos se tuvieron en las muestras hoja ET80 con 447 mg/l de extracto y en tallo ET50 con 748 mg/l de extracto.

Para los ensayos de actividad antioxidante ABTS (Fig. 19) la mayor inhibición la obtuvo tallo ET50 con 46%, seguido por hoja ET80 con 44%. Para el ensayo FRAP (Fig. 18) los resultados indican que el extracto con la mayor actividad fue hoja ET80 con 346 µM ET, seguido por tallo ET50 con 320 µM ET.

## 8.2 Identificación HPLC-DAD

Con respecto a la semejanza cromatográfica de los compuestos ET30, ET50 y ET80, tanto en hoja como en tallo, el análisis de conglomerados (Fig.22-24) indicó que las hojas (ET50 y ET80) y tallo (ET50 y ET80) son cromatográficamente iguales de forma cualitativa, y la hoja y tallo ET30 son cromatográficamente diferentes al resto, respectivamente.

El Cuadro 6 muestra los datos de tiempo de retención (tr), absorbancias de los espectros de UV ( $\lambda$  nm) y la identificación de los compuestos de acuerdo a las señales [masa/z] y el porcentaje de concentración de las muestras. Varios de estos compuestos concuerdan con lo reportado con respecto al tallo por González *et al.*, en el 2007 (naringenina, quercetina), reportado en hoja por Amador *et al.*, 2020 y Cortés

*et al.*, 2021, los flavonoides, naringenina, cirsimaritina, quercetina, eriodictiol, taxifolina, apigenina entre otros.

En trabajos de extractos de hoja de orégano mexicano realizados por García *et al.*, 2014 y Cortés *et al.*, 2019. reportaron que el total de compuestos fenólicos varía entre especies; no obstante, se encontraron consistencias en los siguientes compuestos: ácido cafeico, ácido rosmarínico, derivados del ácido hidroxibenzóico, del ácido hidroxicinámico, y flavonoides

Los compuestos mayoritarios en extractos hidroetanólicos de hoja residual de orégano y tallo fueron: ácido cafeico, naringenina, luteolina, taxifolina, eriodictiol, glucósido de quercetina, los cuales coinciden con lo reportado en diversos artículos para *Lippia graveolens* principalmente en hojas (Arias *et al.*, 2020, González *et al.*, 2021).

### **8.3 Evaluación de la inhibición de las enzimas $\alpha$ -amilasa y $\alpha$ -glucosidasa**

En cuanto a la actividad inhibitoria de las enzimas  $\alpha$ -amilasa y  $\alpha$ -glucosidasa, se obtuvo un efecto favorable mayor en el tallo que en las hojas (Figs. 20, 21). Reportes en los que evaluaron solo hojas de diferentes variedades de orégano mostraron actividad inhibitoria de estas dos enzimas por Gutiérrez *et al.*, 2019, mientras que Amador *et al.*, 2020 solo reportaron actividad inhibitoria expresada en porcentaje de inhibición de la enzima  $\alpha$ -glucosidasa en extracto de hojas de orégano mexicano

Monzón en el 2019 reportó que la inhibición en las enzimas  $\alpha$ -amilasa pancreática y  $\alpha$ -glucosidasa en el intestino delgado de ratones se debió a la acción de los flavonoides: quercetina-3-O-glucósido, luteolina-7-O-glucósido), kaempferol-3-O-glucósido, y apigenina, son los que generarían complejos con el sitio activo de la  $\alpha$ -amilasa de forma más efectiva para inhibirla. En el caso de la  $\alpha$ -glucosidasa, los compuesto quercetin-3-O-(6"-malonil)-glucósido, apigenina-7-O-glucósido kaempferol-3-O-(6"-malonil)-glucósido, naringenina fueron los que presentaron mejores resultados de inhibición. Los resultados del mayor efecto inhibitorio enzimático en el tallo con

respecto a la hoja se debieron a que la concentración de los flavonoides reportados por Monzón con actividad inhibitoria tanto para  $\alpha$ -amilasa y  $\alpha$ -glucosidasa se encontraron en el tallo en mayor concentración (cuadro 6).

#### **8.4 Evaluación toxicológica**

Desde la antigüedad, la medicina tradicional ha usado extensamente las especies del género *Lippia* como analgésicos, antiinflamatorios, antipiréticos, antifúngicos, hipoglucemiantes, tratamiento de problemas respiratorios, etc.; por lo que es importante realizar estudios que garanticen la seguridad en el consumo de estas plantas medicinales, como lo reportado por Satish *et al.*, 2013.

##### **8.4.1 Determinación de DL<sub>50</sub>**

El Procedimiento de Dosis Fijas fue de acuerdo con el procedimiento de la Guía No. 423 de la OECD. En cuanto a la evaluación toxicológica DL<sub>50</sub>, no mostró efectos tóxicos derivados de la ingesta intragástrica de los residuos de hoja y tallo a partir de una dosis única aplicada a grupos de ratones hembra y macho a la dosis de 500 mg, 1000 mg y de 2000 mg/kg de peso de ratón, ya que después de un período de observación de 14 días ningún animal presentó algún nivel de intoxicación o muerte, por lo que se considera a los extractos en categoría 5, producto no tóxico, según los procedimientos estipulados por la OCDE-423. Este resultado concordó con lo reportado por Soto *et al.*, 2012, Bermúdez *et al.*, 2007 y González *et al.*, 2017. quienes trabajaron con extractos de hojas entera de orégano mexicano. Hasta el momento, no hay reportes de la actividad *in vivo* de tallo de orégano en modelo murino CD1.

##### **8.4.2 Evaluación citotóxica *in vitro***

Las propiedades anticancerígenas de los compuestos fenólicos se considera que actúan en diferentes etapas del ciclo celular que modulan la diferenciación celular e inducen apoptosis (Abubakar *et al.*, 2012). Los mecanismos involucrados son diversos; uno de los principales es su capacidad para inactivar radicales libres que pueden causar mutaciones en el ADN y, consecuentemente, bloquear el daño genotóxico

(Cheng *et al.*, 2013). Los extractos del orégano mexicano tienen una alta capacidad para neutralizar radicales libres, según lo reportado por Froehlicher *et al.*, 2009, Bansal *et al.*, 2011, que observaron que la quercetina, quercetina-3-O-ramnósido y el ácido cafeico; compuestos fenólicos abundantes en otras plantas medicinales (*Crateagus ssp*) así como en el orégano mexicano, disminuyen el daño de ADN, la peroxidación de lípidos, la citotoxicidad y la formación de especies reactivas de oxígeno.

Se ha informado que la actividad selectiva de los compuestos citotóxicos frente a las células sanas y tumorales, se debe a un amplio espectro de mecanismos que pueden ser responsables de la resistencia; estos incluyen diferencias en la localización subcelular de Bik y en la función mitocondrial (Studzinska *et al.*, 2016). Ello puede explicar la sensibilidad ejercida por los extractos de hoja y tallo en las líneas celulares, lo cual supone que los compuestos presentes en cada uno de los extractos desempeñan un papel fundamental para la actividad citotóxica de los mismos. Se ha reportado que compuestos como la taxifolina, quercetina y naringenina, poseen efecto citotóxico al inhibir la proliferación de células de cáncer cervical (HeLa) e intervenir en la regulación de la expresión de proteínas apoptóticas p53 y p21, como lo reportado por Amalinei *et al.*, 2014.

Un experimento reportado por Ruthvica *et al.*, 2018 en cuatro flavonoides cítricos: naringenina, apigenina, hesperidina (conc. 0.01%, 0.02 %, 0.1%,) respectivamente y una mezcla limonoide (0,035% glucósido de limonina/glucósido de obacunona) en la malignidad de colon incitada artificialmente en ratas Sprague-Dawley. Se notó que la naringenina y apigenina mostraron una mayor apoptosis de colonocitos superficiales luminales en comparación con el grupo placebo. Lo anterior podría explicar el efecto de los extractos de residuos de hoja y tallo de *Lippia graveolens* que actuaron sobre la línea celular de cáncer de pulmón SK-LU-1 teniendo ambos extractos un  $CI_{50} \leq 30$  mg/ml considerados por el Instituto Nacional de Cáncer (NCI, USA), como activos para tratar algún tipo de cáncer, ya que la naringenina, quercetina, apigenina y hesperidina, forman parte de los componentes más abundantes de los extractos de hoja y tallo del



orégano mexicano, así como el índice de selectividad que para ambos extractos fue superior 2, considerado por Suffenss en 1990 como no tóxico para células normales.

### **8.5 Evaluación de la actividad biológica en marcadores bioquímicos relacionados con el SM**

Al SM se le relaciona con una serie de alteraciones metabólicas como: hiperglucemia, hipertensión, elevados niveles de colesterol y triglicéridos, HDL bajos, resistencia a la insulina, obesidad tipo central, factores relacionados con diabetes mellitus e hipertensión, siendo de reconocimiento tres de estos padecimientos para considerar que una persona padece SM (Francini *et al.*, 2019).

Así, los resultados registrados en los ratones hembra, a los que se les indujo el SM, presentaron niveles elevados de insulina, obesidad central, niveles elevados de triglicéridos y niveles bajos de HDL, por lo que se pudo comprobar el efecto antioxidante que presentó el tallo administrado por 30 días vía intragástrica. Este resultado concuerda con lo reportado por otros autores, que señalan a *L. graveolens* como una especie que es usada como analgésica, antiinflamatoria, antifúngica, antiespasmódica, descongestionante de las vías respiratorias altas, hipoglucemiante y oxitócica en el tratamiento de diferentes enfermedades y malestares (Hernández *et al.*, 2015).

Generalmente, para probar los efectos farmacológicos de un extracto vegetal, las hojas son la parte más utilizada, como lo refieren Palomino & Arroyo 2017, Umezawa *et al.* 2018; Reshidan *et al.* 2019; y Condorhuamán *et al.* 2019. En el caso del orégano mexicano, sus hojas tienen un gran valor comercial, ya que de ellas se extraen los aceites esenciales atribuidos a propiedades culinarias, farmacológicas y cosméticas (García *et al.* 2012; Orona *et al.* 2017; Téllez *et al.*, 2014; Téllez & Nolasco 2017, Carvalho *et al.* 2020).

Los estudios realizados sobre la actividad de la naringenina a dosis de 25 mg/Kg de peso por día en ratas Wistar por 15 días a las que se les indujo diabetes por administración de Streptozotocina, exhibió una potente actividad de inhibidor de la enzima  $\alpha$ -glucosidasa de acuerdo a lo reportado por Priscilla *et al.*, en el 2014. Otro reporte realizado por Annadurai *et al.*, 2012, también con ratas diabéticas a las que se les administró una dosis de 50 mg/Kg de peso de ratón por día reportó reducción de la hiperglucemia, niveles de triglicéridos por supresión de la absorción de carbohidratos del TGI (tracto gastrointestinal), una administración de 25 mg/Kg de peso por día en ratas Wistar ejerció efectos protectores cardiovasculares.

Por lo que los resultados de esta investigación concuerdan con los resultados previamente reportados, ya que el tallo de *Lippia graveolens*, administrado por 30 días a una dosis de 300 mg/kg de peso de ratón, tuvo un efecto favorable en varios parámetros probados con respecto al grupo GMS, mostrando una disminución significativa con respecto al peso corporal, porcentaje de grasa, presión sistólica y diastólica, niveles de glucosa, colesterol total, triglicéridos y hormonas insulina y leptina, como se muestra en cuadro 8, debido a las concentraciones más elevadas de naringenina, eriodictiol y taxifolina encontrados en el extracto de tallo con respecto a la presencia de otros flavonoides.

El creciente interés en los flavonoides, como el caso de la naringenina estudiado en varios modelos animales y estudios en línea celular. Se debe a que sus principales efectos incluyen: inhibición de las enzimas oxidantes como xantina oxidasa, NAPH(nicotinamida,adenina,dinucleótido,fosfato,oxidasa), lipoxigenasa y ciclooxigenasa, quelación de iones metálicos transitorios tales como  $Fe^{2+}$ ,  $Cu^{2+}$ ,  $Zn^{2+}$ , catalizar el transporte de electrones. Debido a este hecho, se han descrito efectos protectores en patologías tales como diabetes mellitus, cáncer, cardiopatías, infecciones víricas, úlcera estomacal y duodenal e inflamaciones, entre otras patologías, (Leonardi *et al.*, 2010).

Diversos flavonoides han mostrado su eficiencia para eliminar los procesos de peroxidación lipídica del ácido linoleico o de los fosfolípidos de las membranas, la peroxidación de los glóbulos rojos o la autooxidación de los homogeneizados de cerebro, como lo reportado por Martínez *et al.*, 2002; aunque en este trabajo no se vio diferencia entre el grupo GMS y el grupo GMS+Ext. Tal vez se debió a no haber dado un plazo mayor en el tratamiento del extracto de tallo o haber administrado una mayor dosis para ver reflejado este efecto.

### **Perfil hormonal**

Los ratones hembra del grupo GMS exhibieron niveles de leptina e insulina en suero significativamente elevados en comparación con el grupo Control y el grupo GMS+EXT.

El principal sitio de acción de la leptina en el hipotálamo es el núcleo arcuato, el cual comprende dos poblaciones de neuronas: la primera libera el neuropéptido Y que representa la vía orexigénica (inductora del apetito); así la leptina disminuye la producción de neuropéptido Y, el cual aumenta la ingesta de alimentos y estimula la secreción de insulina por vía parasimpática. La segunda vía anorexigénica secreta proopiomelanocortina inductora de saciedad. Por este medio la leptina ejerce su efecto disminuyendo la ingesta de alimento, aumentando la oxidación de grasa y el gasto energético favoreciendo así la pérdida de peso corporal como lo reportado por González *et al.*, 2012. Se infiere que, al destruir el núcleo arcuato con la administración de glutamato de sodio en etapa neonatal de los ratones, el eje tejido adiposo hipotalámico se verá dañado, principalmente por la interrupción de la vía anorexigénica. La resistencia a la leptina en los ratones hembra con SM se explica con la relación de sobrepeso y las elevadas concentraciones de leptina. Dicha hormona es secretada por los adipocitos, pero la señal no es censada por el cerebro produciendo una respuesta disminuida o nula. los niveles hemáticos pueden estar elevados en la obesidad, por insensibilidad de los receptores hipotalámicos, o por defecto en el sistema de transporte hacia el sistema nervioso central como lo reportado por Morales *et al.*, 2010.

Almaza *et al.*, en el 2008 reportó que las consecuencias metabólicas de los niveles elevados de leptina, son proporcionales al incremento del tejido adiposo y de la actividad lipogénica del hígado debido a la hiperinsulinemia, además de disminución de la utilización de glucosa por el músculo debida a resistencia por la acción de la insulina. La administración del extracto de tallo de orégano mostró una disminución significativa del porcentaje de grasa, colesterol y triglicéridos, por lo tanto, se observó un efecto favorable que disminuyó la concentración de leptina e insulina en los ratones hembra con SM.

## 9. CONCLUSIONES

- La concentración de etanol-agua al 50% y 80% y la relación masa/volumen 1/30 fueron las más eficientes para la extracción de compuestos fenólicos tanto para hoja como para tallo.
- Existe diferencia significativa entre los residuos de hojas y tallo del orégano; aunque la hoja presentó en la mayoría de los análisis mayor efecto antioxidante, fue el tallo el que obtuvo la mejor actividad en la inhibición de las enzimas  $\alpha$ -amilasa y  $\alpha$ -glucosidasa.
- Se encontró que la dosis letal media de ambos extractos fue  $\geq 5000$  mg/kg sin manifestación de signos tóxicos, por lo que estos extractos son considerados no tóxicos.
- Las pruebas de citotoxicidad, *in vitro*, resultaron para los extractos de hoja y tallo con efecto neoplásico en células de cáncer SK-LU-1 y no resultaron tóxicos, para la línea celular normal HFF-1, por lo que su consumo es seguro.
- El SM constituye un problema de salud evidente, no solo por su elevada prevalencia, sino también por su papel como factor de riesgo para otras enfermedades que implican una gran morbi-mortalidad, como las enfermedades cardiovasculares y la diabetes mellitus; así, el extracto de tallo usado en un modelo murino con SM, resultó con efecto favorable en la disminución de la mayoría de los variables evaluadas en este estudio con respecto al grupo control y al grupo GMS.
- Por los resultados obtenidos en este estudio de investigación, con los extractos de residuos de hoja y tallo de *Lippia graveolens* H.B.K. que son aproximadamente un 80 % de la planta, se tiene una gran área de oportunidad para el uso del extracto de tallo principalmente relacionado con alteraciones metabólicas.

## 10. RECOMENDACIONES

- Se propone el estudio de nuevos indicadores de bioactividad del extracto de tallo sobre la patología del SM como actividad enzimática hepática.
- Complementar con estudios de genotoxicidad *in vivo* para los extractos de hoja y tallo del orégano mexicano.
- Seguir con un esquema clínico fase I, para medir la actividad del extracto de tallo del orégano mexicano en personas sanas.

## 11. BIBLIOGRAFIA

1. **Acevedo D., Navarro M., Monroy L., (2013)** Chemical Composition of the essential oil extracted from Oregano leaves (*Oreganun vulgare*), información tecnológica vol. 24, no 4, pp.43-48.
2. **Ababukar I., Gautret P., Brunete G., Blumberg L., Skan A. (2012)** Global perspectives for prevention of infectious diseases associated with mass gatherings, v.12, no. 1 pp.66-74.
3. **Aguirre-Joya J., Zugasti-Cruz A., Belmares-Cerda R., Aguilar C., De la Garza-Toledo H. (2012)** Actividad antioxidante de algunas plantas tropicales, subtropicales y semidesérticas. Revista Científica de la Universidad Autónoma de Coahuila. v. 4, no. 7 pp.1-23.
4. **Almanza-Pérez J., Blancas-Flores G., García-Macedo R., Alarcón-Aguilar F., Cruz M. (2008)** Leptina y su relación con la obesidad y la diabetes mellitus tipo 2, Gac Méd Méx v. 144, no. 6, pp. 535-542.
5. **Álvarez-Castro Paula, Sanguiau-Alvarellas Susana, Brandón-Sandá Iria, Cardido Fernando (2011),** Función endócrina en la obesidad, Endocrinología y nutrición pp 422-424.
6. **Amador S., Nieto A., Ramírez M., Martínez M., Maldonado E. (2020).** Cytotoxic, anti-inflammatory, and  $\alpha$ -glucosidase inhibitory effects of flavonoids from *Lippia graveolens* (Mexican oregano). Medicinal Chemistry Research v. 29, pp. 1497–1506.
7. **Amalinei C., Cianga:, Balan R., Cianga P., Giusca P., Draga I. (2011)** Immunohistochemical analysis of steroid receptors, proliferation markers, apoptosis related molecules, and gelatinases in non-neoplastic and neoplastic endometrium, Annals of Anatomy Annal s of Anatomy v.193, no. 1 pp. 43-55.
8. **Amaya-Rodríguez Lorena Maribel (2013)** Tesis Determinación de fenoles, flavonoides y capacidad antioxidante en melaza, azúcar blanco y moreno en el ingenio chaparrastique por el método de espectrofotometría ultravioleta-visible, Universidad de Antioquía pp. 23-34.

9. **Annadurai T., Muralidharan A., Joseph T., Hsu M., Thomas P., Geraldine P. (2012)** Antihyperglycemic and antioxidant effects of a flavanone, naringenin, in streptozotocin– nicotinamide-induced experimental diabetic rats, *J. Physiol. Biochem*, v.68, no.3, pp.307-318.
10. **Angulo C., Flores J., Tejada C., Campos V. (2004)** “Orégano oro verde del semidesierto: la riqueza de los bosques mexicanos más allá de la madera; experiencia de comunidades rurales SEMARNAT Mex. pp. 60-65.
11. **Antuna-Puente B., Febe B., Fellahi F., Bastar P., (2008)** Adipokines: The missing link between insulin resistance and obesity *Diabetes & Metabolism* v 34, no.1, pp 2-11.
12. **Aragón-Gallego A., Blasco-González L., Gravinety-Pérez N. (2018)** Obesidad, *Sociedad Española de Endocrinología, Pedriática* pp.4-6.
13. **Arcila-Lozano C., Loarca-Piña G., Lecona-Urbe S., González de Mejía E (2004)**. El orégano: propiedades, composición y actividad biológica de sus componentes *ALAN* v.54 n.1, pp 2-20.
14. **Arias J., Mejía J., Córdoba Y., Martínez J., Stashenko E., del Valle J. (2020)** Optimization of flavonoids extraction from *Lippia graveolens* and *Lippia origanoides* chemotypes with ethanol-modified supercritical CO<sub>2</sub> after steam distillation. *Industrial Crops & Products*. pp. 1-9.
15. **Arroyo J., Martínez J., Ronceros G., Palomino R., Villarreal A, Bonilla P. (2012)** Efecto hipoglicémico coadyuvante del extracto etanólico de hojas de *Annona muricata* L (guanábana), en pacientes con diabetes tipo 2 bajo tratamiento de glibenclámda. *An Fac Med* v. 70 no. 3 pp.163– 167.
16. **Asensio C. (2013)** Tesis. Utilización de aceites esenciales de variedades de orégano como conservante antimicrobiano, antioxidante y de las propiedades sensoriales de alimentos: quesos cottage, ricota y aceite de oliva. Universidad de Bolivia pp. 6-20.
17. **Ávalos A., Pérez-Urria E. (2009)** Metabolismo secundario de plantas. *Reduca (Biología)*. Serie Fisiología Vegetal, v.2, no.3, pp. 119-145.



18. **Ávila-Sosa R., Navarro-Cruz A., Vera-López O., Dávila-Márquez R, Melgoza-Palma N., Meza-Pluma R. (2011)** Romero (*Rosmarinus officinalis* L.): una revisión de sus usos no culinarios. Ciencia, v. XV, no. 43 pp. 23-36.
19. **Avelino-Flores M., Bibbins-Martínez M., Vallejo-Ruiz V., Reyes-Leyva J. (2019)** Evaluación *in vitro* de la actividad citotóxica y antitumoral de plantas medicinales recomendadas en cuetzalan del progreso, puebla, méx, Polibotánica No. 47, pp.113-136.
20. **Bahadoran Z., Mirmiran P., Azizi F. (2013).** Dietary polyphenols as potential nutraceuticals in management of diabetes: a review. Journal of Diabetes & Metabolic Disorders, v.12, no. 1 pp. 43.
21. **Bansal A., Bilaspuri G. (2011)** Impacts of Oxidative Stress and Antioxidants on Semen Functions, Veterinary Medicine International. pp. 1-7.
22. **Baudrand R., Arteaga E., Moreno M. (2010)** El tejido graso como modulador endócrino: Cambios hormonales asociados con la obesidad, Rev Med Chile pp.1294-1301.
23. **Bello-Chavolla O. (2018)** Fisiología del tejido adipose Instituto nacional de geriatría ResearchGate pp.23-45.
24. **Bermúdez D., Monteagudo E., Bofill M., Díaz L., Roca A., Betancourt E., Silveira E. (2007).** Evaluación de la toxicidad aguda de extractos de plantas medicinales por un método alternativo REDVET. Revista electrónica de Veterinaria, v. VIII, n. 3, pp. 1-7 .
25. **Biurete-Guzmán A. Juárez-Hernández E., Sieiro-Ortega E., Romero-Viruegas R. (2009)** Nutraceuticals. What is convenient to know, Revista Mexicana de Pediatría, vol.76 num.3 mayo-junio, pp. 136- 145.
26. **Bhagwat, S.A., Haytowitz, D.B., Holden, J.M. (2011).** USDA database for the flavonoid content of selected foods, release 3. U.S. Department of Agriculture pp. 3-23.
27. **Brand-Williams W., Cuvelier M., Berset C. (1995)** Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. Lebensm. Wiss. Tehnol., v.28, pp.25-30.
28. **Butera D, Tesoriere L, Di Guadio F, Bongiorno A, Allegra M, Pintaudi A M, Kohen Ry Livera M. A. (2002).** Antioxidant Activities of Sicilian Prickly pear

- (Opuntia ficus-indica) Fruit Extracts and Reducing Properties of its Betalainas: Betania e Indicaxantina. *Jornal of Agricultural and Food Chemistry*. 50: 6895-6901.
29. **Caicedo-Urresta C., Vivero-Rosero D. (2017)** Tesis: Factores alimentarios de riesgo para desarrollar síndrome metabólico en población indígena Pontificia Universidad de Ecuador pp 14-35.
  30. **Cano A., Villavicencio E. (2012)** Cultivo de Orégano, opción productiva para las zonas semidesérticas. Desplegable para Productores Núm. 28. Instituto Nacional de Investigaciones Forestales. *Medicina Legal de Costa Rica* v.34, no.1 pp. 1-19.
  31. **Carvalho F., Silva E., Nunes E., Felipe F., Ramos K., et al. (2020)** Effects of the solid lipid nanoparticle of carvacrol on rodents with lung injury from smoke inhalation, *Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology* pp. 445-455.
  32. **Carvajal-Carvajal C. (2017)** Síndrome metabólico: definiciones, epidemiología, etiología, componentes y tratamiento pp. 1-20.
  33. **Casarrubios-Calvo M. (2018)** Tesina: El síndrome metabólico, Facultad de Farmacia Universidad Complutense pp. 4-20.
  34. **Céspedes E., Castillo J. (2008)** La peroxidación lipídica en el diagnóstico del estrés oxidativo del paciente hipertenso. ¿Realidad o mito? *Revista el Cisco* pp 1-8.
  35. **Chimal-Vega B. (2018)** tesis: Generación de mutantes de leptina humana como alternativa terapéutica en el tratamiento de la obesidad, pp. 33-44.
  36. **Conde-Ponce J. (2019)** Perspectiva de las plantas medicinales en el síndrome metabólico, *REV PERU MED INTEGRATIVA* v.4, no.1 pp. 2-3.
  37. **Condorhuamán-Figueroa M., Rojas-Ríos L., Collado-Pacheco A., Lizano-Gutiérrez J., Hernández- Fernández E., Contreras- López E. (2019)** Efecto del extracto etanólico de *Chuquiraga spinosa* (huamanpinta) sobre el síndrome metabólico e hipercolesterolemia inducida en ratas. *Revista peruana de medicina integrativa*, pp.13-28.
  38. **Conlon M, Bird A. (2014)** The Impact of Diet and Lifestyle on Gut Microbiota and Human Health. *Nutrients*; 7(1): 17-44.

39. **Coronado M., Vega S., Gutiérrez R., Vázquez M., Radilla C. (2015)** Antioxidantes; perspectiva actual para la salud humana. *Rev Chil Nutr* v. 42, no. 2, pp. 206-232.
40. **Corral-Torrecillas L (2011)** tesis: Aprovechamiento de los residuos que se generan en la extracción del aceite esencial de orégano (*Lippia graveolens* HBK. s.l.), CIIDIR-Durango pp.35-48.
41. **Cortés-Chitala M., Flores-Martínez H., Orozco-Ávila I., León-Campos C., Suárez-Jacobo A., Estarrón-Espinosa M., López-Muraira I. (2021)** Identification and Quantification of Phenolic Compounds from Mexican Oregano (*Lippia graveolens* HBK) Hydroethanolic Extracts and Evaluation of Its Antioxidant Capacity *Molecules* pp.1-18.
42. **Dang, Y., Zhang, H., Xiu, Z. (2014)**. Microwave-assisted aqueous two-phase extraction of phenolics from grape (*Vitis vinifera*) seed. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology* v. 89 no.10, pp. 1576-1581.
43. **De B., Bhandar K., Katakam P., Goswami T. (2019)** Development of a standardized combined plant extract containing nutraceutical formulation ameliorating metabolic syndrome components. *SN Applied Sciences*, pp.1-12
44. **Delgado J. (2016)** Tesina Productos naturales en la prevención y tratamiento del Síndrome Metabólico Universidad complutense pp. 1-20.
45. **Delgado-Zambrano M. (2020)** Evaluación de la capacidad antioxidante de los extractos alcohólico y acuoso de la cascara de la mandarina *Citrus reticulata* en relación de un anitioxidante commercial. Universidad Politénica Salesiana sede Cuenca- Ecuador pp. 34-42.
46. **Den D., Tsiani E. (2019)** Antidiabetic Properties of Naringenin: A Citrus Fruit Polyphenol. *Bio-molecules* pp. 1-21.
47. **Diab-Cáceres L. (2018)** tesis Efecto del consumo de etanol sobre el sistema nervioso central en un modelo animal de síndrome metabólico Universidad JAUME I, Área de Fisiología pp. 35-48.
48. **Do-Dyem Q., Angkawijaya A., Tran-Nguyen P., Huong-Huynh L., Soetaredjo F., Ismadji S. (2014)**. Effect of extraction solvent on total phenol content, total

- flavonoid content, and antioxidant activity of *Limnophila* aromatic. Journal and food and drug analysis, v.22 pp 296-302.
49. **Fernández-Travieso J. (2016)** Síndrome Metabólico y Riesgo Cardiovascular Revista CENIC. Ciencias Biológicas, v. 47, no 2, pp. 106-119.
  50. **Ferreira I., Luengo E. (2007)**. La dieta como concepto terapéutico. Conceptos de alimento funcional y de nutraceutico. Situación actual de los alimentos funcionales y nutraceuticos. Aspectos legales. Alimentos funcionales y nutraceuticos. pp. 1-11.
  51. **Flores-Martínez H., León-Campos C., Estarrón-Espinosa M., Orozco-Ávila I. (2016)** Optimización del proceso de extracción de sustancias antioxidantes a partir del orégano mexicano (*Lippia graveolens* HBK) utilizando la metodología de superficie de respuesta (MSR), Rev. Mexicana de Ingeniería Química v.15, no.3, pp.773-785.
  52. **Flores R. (2009)**. Potencial productivo del orégano (*Lippia graveolens* HBK.) y calidad de su aceite esencial en dos localidades de El Mezquital, Dgo. Tesis de maestría. CIIDIR IPN Durango. Durango, México pp.130.
  53. **Francini F., Spinelli P., Calo L. (2019)** Potential role of phytochemicals in metabolic syndrome prevention and therapy. Diabetes, Metabolic Syndrome and Obesity: Targets and Therapy v.12, pp. 1987–2002.
  54. **Froehlicher T., Hennebelle T., Martin-Nizard F., Cleenewerck P., Hilbert J., Trotin F., Grec S. (2009)** Phenolic profiles and antioxidative effects of hawthorn cell suspensions, fresh fruits, and medicinal dried parts, Food Chemistry, V. 115, no. 3, pp. 897-903.
  55. **Galina-Hidalgo M., Ortiz- Rubio M., Guerreo Cruz M. (2018)** Estrés oxidativo y antioxidantes Avances en Investigación agropecuaria v.22 no.1, pp.47-61.
  56. **Gallegos-Flores P., Bañuelos-Valenzuela R., Echeverría-Cháirez F., Mesa López C., Rodríguez-Tenorio D. (2019)** Evaluación diferencial de extractos de orégano en la producción de ácidos grasos volátiles y metano durante fermentación ruminal *in vitro* Abanico Veterinario v.9 pp. 1-18.
  57. **García-García E., De la Llata-Romero M., Kaufer-Horwitz M., Tusié-Luna M Calzada-León R Y et al., (2008)** obesidad y el síndrome metabólico como

- problema de salud pública. Una reflexión, *Acta Pediatr Mex* v.29 no.4, pp. 227-246.
58. **García-Pérez E., Castro-Álvarez F., Gutiérrez-Urbe J y García-Lara (2012)** Revision of the production, phytochemical composition, and nutraceutical properties of Mexican oregan, *Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas* Vol.3 no 2, 1 de marzo - 30 de abril, 339-353.
59. **Godínez-Gutiérrez S., Marmolejo-Orozco G., Márquez-Rodríguez E. Siordia-Vázquez J., Baeza Camacho R. (2002)** La grasa visceral y su importancia en obesidad, *Rev. de Endocrinología y Nutrición* v.10 no. 3, pp. 121-127.
60. **Gonzalez M., Hernández M., Kite G., Vázquez M. (2007)**, Antioxidant activity of flavonoids from the stem of the Mexican Oregan, (*Lippia graveolens* HBK var *berlandieri* Schauer, *Revista Fitotecnia Mexicana*, vol.30, Issue 1, pp 43-49.
61. **González-Cruz L., Hernández-Castillo E., Juárez-Goiz J., Flores-Martínez N., Bernardino-Nicanor A. (2018)** Efecto de tratamientos térmicos tradicionales sobre la capacidad antioxidante y contenido de carotenoides de nopalitas, *Revista Mexicana de Ingeniería Química*, v.17 no.3 pp. 823-834.
62. **Grande C., Delgado J. (2015)** Cadena de valor de plantas aromáticas, medicinales y condimentarias. Una industria en pleno desarrollo. Editorial Bonaventuriana. Colombia. Pp.34-45.
63. **Grima Serrano A. (2010)**. Síndrome Metabólico, *Cardiología Laboral y rehabilitación cardiaca*, Clínica Asepeyo Valencia monografía pp. 23-45.
64. **Godínez-Gutiérrez S., Marmolejo-Orozco G., Márquez-Rodríguez E., Siordia-Vázquez J., Baeza-Camacho R. (2002)** La grasa visceral y su importancia en la obesidad, *Revista de Endocrinología y Nutrición* v 10, No. 3 pp. 121-127.
65. **Guala M., Elder H., Perez G., Chiesa A. (2009)** Evaluation of the Antioxidant Power of Fractions of *Schinus molle* L. Essential Oil obtained by Vacuum Distillation. *Information Technological*. Vol. – 20° 2, pp 83-88.
66. **Gülçin I. (2012)** Antioxidant activity of food constituents: An overview. *Archives of Toxicology*, 86(3), 345-391.

67. **Gutiérrez- Avella D., Ortiz-García C., Mendoza Cisneros A. (2008)** Medición de Fenoles y Actividad Antioxidante en Malezas Usadas para Alimentación Animal, Universidad Autónoma de Querétaro, pp. 1-5.
68. **Gutiérrez-Grijalva E., Angulo-Escalante M., León-Félix J., Basilio J. (2016)** Estabilidad Antioxidante de Compuestos Fenólicos de Tres Especies de Orégano (*Hedeoma patens*, *Lippia graveolens*, *Lippia palmeri*) Durante Digestión Gastrointestinal In Vitro. Memorias del segundo Congreso Internacional de Red Nacional de Investigación, Innovación y desarrollo Tecnológico en Alimentos Funcionales y Nutraceuticos, pp 60-61.
69. **Gutiérrez E., Antunes M., Acosta B., Gutiérrez J., Heredia J. (2019)** Cellular antioxidant activity and in vitro inhibition of  $\alpha$ -glucosidase,  $\alpha$ - amylase and pancreatic lipase of oregano polyphenols under simulated gastrointestinal digestion. Food Research International. Pp. 676-686.
70. **Gutiérrez E., Picos M., Leyva N., Criollo M., Vazquez G., (2018)** Flavonoids and Phenolic Acids from Oregano: Occurrence, Biological Activity and Health Benefits. Plants v.7 n.2 pp.1-23.
71. **Gutiérrez-Macías P., Peralta-Cruz J., Borja-de-la-Rosa A., Barragán-Huerta B. (2016)** Peltomexicanin, a Peltogynoid Quinone Methide from Peltogyne Purple Heartwood. Molecules v. 21 pp. 186.
72. **Heimler D., Vignolini P., Dini M., Romani A. (2005).** Rapid tests to assess the antioxidant activity of Phaseolus vulgaris L. Dry beans. J. Agric. Food Chem v. 53 No.8 pp. 3053-3056.
73. **Hernández-Hernández E., Ponce-Alquicira E., Jaramillo-Flores M., Guerrero-Legarreta I. (2009)** Antioxidant effect rosemary (*Rosmarinus officinalis* L.) and oregano (*Origanum vulgare* L.) extracts on TBARS and colour of model raw pork batters, Meat Science 81 pp. 410–417.
74. **Hernández T., García-Bores, A., Serrano R., & Ávila G., Dávila, P., & Cervantes H., Peñalosa I., Flores-Ortiz, C., Lira, R. (2015).** Fitoquímica y actividades biológicas de plantas de importancia en la medicina tradicional del valle de tehuacán-cuicatlán. *Tip Revista Especializada en Ciencias Químico-Biológicas*, v. 8, no.2, pp. 116-121.

75. **Huerta, C. (1997).** Orégano mexicano: oro vegetal. *Bio-diversitas*, v.15 pp.8-13.
76. **Huang D., Boxin O. Ronald P. (2005)** the Chemistry behind Antioxidant Capacity Assays, *Agricultural and Food Chemistry*, pp. 1841– 856.
77. **Irala-Rivera N., Cruz-Casillas F., Villanueva-Maciel G., Ochoa-Zermeño S., Rivas-Arreola. (2020)** Extracción de licopeno a partir de residuos de jitomate por método con solventes. *Investigación y Desarrollo en Ciencia y Tecnología de Alimentos* v.5, pp 343-347.
78. **Jaramillo-Juárez F., Valdivia-Flores A. (2016)** libro Fundamentos de estrés oxidativo celular. Universidad Autónoma de Aguascalientes pp. 45-51.
79. **Jiménez-Mendoza E. (2018).** Tesis: Evaluación del extracto fenólico de corteza de *Juglans regia* L. en ratones con síndrome metabólico inducido por neuro intoxicación neonatal con glutamato monosódico pp.26-30.
80. **Johar D., & Bernstein L. (2017).** Biomarkers of stress-mediated metabolic deregulation in diabetes mellitus, *diabetes research and clinical practice Elsevier* pp 222 –229
81. **Kukoski E., Asuero A., Troncoso A., Mancini J., Fett R. (2005)** Aplicación de diversos métodos químicos para determinar actividad antioxidante en pulpa de frutos, *Ciênc. Technol. Aliment., Campinas*, v. 25 no.4, pp. 726-732.
82. **Kwon Y., Apostolidis E., Shety K. (2008)** *in vitro* studies of eggplant (*Solanun melongena*) phenolics as inhibitors of key enzymes relevant for type 2 diabetes and hypertension *Bioresource Technology* v.99, no. 8 pp. 2981-2988.
83. **López-Martínez L., Aguilar-Cisneros L., Dublán-García O., (2013)** Actividad antioxidante e inhibidora de  $\alpha$ - glucosidasa y  $\alpha$ -amilasa de tres variedades de cebolla (*Allium cepa* L.) *Revista Electrónica Nova Scientia*, no 12 Vol. 6 (2), 2014. ISSN 2007 - 0705. pp: 234 – 247.
84. **Martínez-Flores S., González-Gallego J., Culebras J., Tuñón M. (2002)** Los flavonoides: propiedades y acciones antioxidantes. *Nutr. Hosp. V. XVII*, no. 6, pp. 271-278.
85. **Martínez-Martínez Ernesto, Rodríguez Cristina, Galán María, Miana María, Jurado-López Raquel, Bartolomé María, Luaces María, Islas Fabián, Martínez-González José, López-Andrés Natalia, Cachofeiro V. (2016),** The

- lysyl oxidase inhibitor ( $\beta$ -aminopropionitrile) reduces leptin profibrotic effects and ameliorates cardiovascular remodeling in diet-induced obesity in rats, *Journal of Molecular and Cellular Cardiology* pp. 1-23.
86. **Martínez R., Puga R., Hernández S.L., Loarca P., Mendoza S. (2008)** Antioxidant and Antimutagenic Activities of Mexican Oregano (*Lippia graveolens* Kunth), *Plant Foods Hum. Nutr* 63, pp 1-5.
  87. **Mata C., Pestana C., Lares M., Porco A., Giacomini M., Brito S., Castro J. (2016)** Relación entre la ingesta de antioxidantes, factores nutricionales e indicadores bioquímicos en voluntarios sanos. ARCHIVOS LATINOAMERICANOS DE NUTRICIÓN. Órgano Oficial de la Sociedad Latinoamericana de Nutrición. V. 66 n3, pp. 201-210.
  88. **Meagher E. Fitz Gerald G. (2000)** Indices of lipid peroxidation *in vivo*: strengths and limitations. *Free Radic Biol Med*, v. 28 pp. 1745-1750.
  89. **Mendoza-Mesa D., Medina-Valdés R. (2015)** Inhibición in vitro de las enzimas alfa-amilasa y lipasa pancreática por fracciones fenólicas de extractos etanólicos de hojas de Yacón (*Smallanthus sonchifolius* Poepp. & Endl). *Avances en Química*, v. 10, no. 1, pp. 33-40.
  90. **Monzón-Daza J. (2019)** tesis: Estudio metabólico de hojas de *passiflora ligularis* juss y su relación con la actividad inhibitoria sobre  $\alpha$ -amilasa y  $\alpha$ -glucosidasa Universidad Nacional de Colombia, Facultad de Ciencias, Departamento de Química Bogotá, Colombia pp.12-35.
  91. **Mora-Agüero S., Zeledón-Aguilera A., Vargas-Rubio T. (2019)** Estrés oxidativo y antioxidantes, *Revista Médica Sinergia* v.4 no 5, pp. 89 – 100.
  92. **Morales-González Angy Tatiana (2017)** tesis Determinación del potencial inhibidor del extracto de fracciones de *Pasiflora manicata* Sobre enzimas digestivas  $\alpha$ -amilasa,  $\alpha$ -glucosidasa y lipasa pancreática: pp. 4-8.
  93. **Morales-González J. (2010)** La obesidad un enfoque multidisciplinario. Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo, primera edición 2010, pp. 22-34.
  94. **Morales M. Carvajal C. (2010)** Obesidad y resistencia a la leptina. *Gaceta Médica Boliviana*, v.33, no. 1, pp. 63-68.



95. **Mosquera O., González L., Cortés Y., Camargo J. (2015).** Caracterización fitoquímica, determinación del contenido de lignina y la actividad antioxidante de los culmos de *Guadua angustifolia* KUNTH. Facultad de Ciencias Básicas v. 11, n. 2, pp.124- 135.
96. **Morais- Faleiros de Paula., Lumy-Takeuch P., Vannucchi H. (2018)** Efecto del resveratrol, la catequina y el gingerol en la obesidad; evidencias Incompletas. Facultad de Medicina de Ribeirão Preto da Universidad de São Paulo. Brasil v. XII, no.1, pp. 37-46.
97. **Mueller M., Lukas, B., Novak J., Simoncini, T., Riccardo A. Jungbauer A. (2008)** Oregano: a Source for peroxisome proliferator-activated receptor y antagonists. J. Agric. Food Chem. 56:11621-11630.
98. **Muñoz-Jáuregui A., Ramos-Escudero F., Alvarado-Ortiz C., Castañeda-Castañeda C. (2007)** Evaluacion de la capacidad antioxidante y contenido de compuestos fenolicos en recursos vegetales promisorios Rev. Soc. Quim Perú, v 73, no. 3 pp.142-149.
99. **Mosmann T. (1983).** Rapid Colorimetric Assay for Cellular Growth and Survival: Application to Proliferation and Cytotoxicity Assays. J. Immunol. Methods v. 65 pp. 55-63.
100. **NOM 059 SSA (2016)** Buenas Prácticas de Fabricación de medicamentos.
101. **NOM 007 SEMARNAT (1997),** Establece los procedimientos, criterios y especificaciones para realizar el aprovechamiento, transporte y almacenamiento de ramas, hojas o pencas, flores, frutos y semillas.
102. **NOM 062 ZOO- 1999** Especificaciones técnicas para la producción, cuidado y uso de los animales de laboratorio.
103. **Nuengchamnong N, Hermans-Lokkerbol A, Ingkaninan K. (2004).** Separation and detection of the antioxidant flavonoids, rutin and quercertin, using HPLC coupled on-line with colorimetric detection of antioxidant activity. Naresuan University Journal.12: 25-37.
104. **Nuevas-Paz L., Álvarez de León J., Suárez-Torras A., Sordo-Martínez L., González-Hernández L., Acosta-Esquivarosa J. (2012)** Estabilidad físico-

- química y microbiológica de la corteza fresca de *Mangifera indica* L. Revista Cubana de Plantas Medicinales. v. 17 no.2, pp. 125-133.
105. **OECD-423-1991 (2001)** GUIDELINE FOR TESTING OF CHEMICALS, Acute oral Toxicity- Acute Toxic class Method. Pp. 1-12.
  106. **Oliveira-Leal V., Mafra D. (2013)** Adipokines in obesity Graduate Program in Medical Sciences, Federal Fluminense University (UFF), Niteroi, Brazil, pp 87-94.
  107. **Orellana-Méndez R., Alonzo-Villagrán O., Quintana- Fernando S. (2010)** Caracterización de la función diastólica y sistólica en pacientes con diagnóstico de síndrome metabólico Hospital General San Juan de Dios, Guatemala, Guatemala, pp. 32-35.
  108. **Orona-Castillo I., Salvador-Almazán, A., Espinoza-Arellano José. Vázquez C. (2017)** Recolección y comercialización del orégano (*lippia* spp) en el semi-desierto mexicano un caso de estudio: reserva ecológica municipal sierra y cañón de Jimulco, México Revista Mexicana de Agronegocios, v. 41, pp. 1-20.
  109. **Ortega-Cabello L., Cruz-Monterrosa R., Martínez-Casares R., Valencia-Ledezma, O. (2018)** USO DE FLAVONOIDES COMO INGREDIENTE ACTIVO EN ALIMENTOS FUNCIONALES v.11, pp. 121-127.
  110. **Ortega-Villarreal A., López-Hernández A., González-Martínez B (2016)** DETERMINACIÓN DEL CONTENIDO DE COMPUESTOS FENÓLICOS PRESENTES EN EXTRACTOS ALCOHÓLICOS DE SEMILLA DE CHÍA (*Salvia hispánica* L.) Universidad Autónoma de Nuevo León, Facultad de Salud Pública y Nutrición, Laboratorio de Alimentos v 1, no. 2 pp. 424-429.
  111. **Ortiz-Segura María del Carmen (2011)** Tesis: evaluación del extracto etanólico de *callea urticifolia* (mill.) dc. sobre la regulación de la secreción de adipocinas asociadas a la resistencia a la insulina pp.32-45.
  112. **Pacheco-Armenta M., Jáquez-Torres J. (2017)** Prevalencia del síndrome metabólico en la consulta externa, Rev Sanid Milit Mex v. 71 pp.264-275.
  113. **Pacheco F., Peraza M., Pinto I. (2020)** Flavonoides: Micronutrientes con amplia actividad biológica, Research Geat pp.2-20.
  114. **Palomino-Flores C., Arroyo-Acevedo J. (2017)** Efecto preventivo del extracto etanólico de las hojas de *Annona muricata* L (guanábana) sobre síndrome

- metabólico inducido en ratas, Rev. Peruana de medicina integrativa v. 2, no. 7 pp. 30-37.
115. **Palomo I., Moore R., Alarcón M., Rojas A. (2009)** Fisiopatología del estado protrombótico en el síndrome metabólico ACTA MÉDICA COLOMBIANA VOL. 34 no 2 ~ ABRIL-JUNIO pp. 80-82.
116. **Pereyra-Rodríguez J., Melo-Ascanio J., Caballero-Chavarro M., Rincón-Gonzales G. (2016)** Síndrome Metabólico, apuntes de interés. Revista Cubana de Cardiología y Cirugía Cardiovascular, v.22, no.2, pp.109-116.
117. **Pérez-Gutiérrez R. (2014)** Effect of Mexican Oregano (*Lippia graveolens* Kunth) on Streptozotocin Induced Diabetic Mice and its Role in Regulating Carbohydrate Metabolic Enzymes and Their inhibitory Effect on the Formation of Advanced Glycation end Products, Annual Research & Review in Biology v.4, no. 23, pp. 3470-3491.
118. **Pérez H. (2006)** Nutracéuticos: componente emergente para el beneficio de la salud. ICIDCA. Sobre los Derivados de la Caña de Azúcar, vol. XL, no. 3, pp. 20-28.
119. **Pérez-Santiago G., González-Castillo M., Alejandro-Iturbide G., González Guereca M (2011)**, EL ORÉGANO MEXICANO: ESTADO ACTUAL DEL CONOCIMIENTO, LA CASA EDITORIAL DE DURANGO pp. 19-34.
120. **Priscilla H., Roy D., Suresh A., Kumar V., Thirumurugan K. (2014)** Naringenin inhibits  $\alpha$ -glucosidase activity: a promising strategy for the regulation of postprandial hyperglycemia in high fat diet fed streptozotocin induced diabetic rats. Chem. Biol. Interact., 210, pp. 77-85.
121. **Rabadán-Chávez G., Quevedo-Corona L., Millar-García A., Reyes-Maldonado E., Jaramillo Flores M., (2015)** Cocoa powder, cocoa extract and epicatechin attenuate hypercaloric diet-induced obesity through enhanced  $\beta$ -oxidation and energy expenditure in white adipose tissue Journal of Functional Foods v. 20, pp. 54–67.
122. **Real S., Gutiérrez G., Domínguez A., Paniagua N., Michicotl M., Jaramillo M. (2020)** Downregulation of proinflammatory liver gene expression by *Justicia*

- spicigera* and kaempferitrin in a murine model of obesity-induced by a high fat diet. Journal of Functional Foods. pp. 1-12.
123. **Reales N., Gómez P., Salim C., Bravo M., Gómez E. (2010)** Actividad antioxidante de extractos hojas de olivo cultivar coratina, del valle central de Catamarca, Revista del CIZAS v. 11, no.1, pp.18-30.
124. **Ren B., Quin W., Wang S., Cacerola Ch. Wang L., (2016)** Apigenin and Naringenin Regulate glucose and lipid metabolism and ameliorate vascular dysfunction in type 2 diabetic rats. European Journal of Pharmacology, v. 773, pp. 13-23.
125. **Robberecht H., De Bruyne T., Hemans N. (2018)** Biomarkers of the metabolic syndrome: influence of selected foodstuffs, containing bioactive components. Phytochem Rev. v. 17 pp. 351–377.
126. **Rodríguez-Rodríguez E., Perea J., López-Sobaler A., Ortega R. (2009)** Obesidad, resistencia a la insulina y aumento en los niveles de adipocinas: importancia de la dieta y el ejercicio físico, Nutrición Hospitalaria v.24, no.4, pp.415-421.
127. **Rojas S, Lopera JS, Uribe A, Correa S, Perilla N, Marín J (2015)** Consumo de nutraceuticos, una alternativa en la prevención de las enfermedades crónicas no transmisibles. Revista Bio salud, v.14, n.2, pp. 91-103.
128. **Rosales Alemán V. (2015)** Tesis. Evaluación del efecto antioxidante y antimicrobiano de los residuos de orégano (*lippia graveolens*), Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro, pp. 20-28.
129. **Rosales-Castro M., González-Laredo R., Rocha-Guzmán, N., Gallegos-Infante J., Rivas-Arreola M., Karchesy J. (2012)** Antioxidant activity of fractions from *Quercus sideroxylla* bark and identification of proanthocyanidins by HPLC-DAD and HPLC-MS pp.1-22
130. **Rosero, J.C., S. Cruz, C. Osorio and N. Hurtado. 2019.** Analysis of Phenolic Composition of Byproducts (Seeds and Peels) of Avocado (*Persea americana* Mill.) Cultivated in Colombia. Molecules v.24, pp. 3209-3215.

131. **Sahu A. (2011)** Intracellular Leptin-Signaling Pathways in Hypothalamic Neurons: The Emerging Role of Phosphatidylinositol-3 Kinase-Phosphodiesterase-3B-cAMP Pathway, *Neuroendocrinology* v.93, pp.201–210
132. **Sánchez-Ramos G., Quezada F., Lara-Villalón M., Medina- Martínez T., Pérez-Quilantal L. (2011)** Parámetros ambientales y abundancia del orégano mexicano (*Lippia graveolens*) en el estado de Tamaulipas. *Ciencia UAT*, vol. 6, no.1, pp. 24-31.
133. **Santa-González G., Camargo M. (2017)** Protección celular antioxidante y respuesta adaptativa inducida por estímulos inducidos crónicos, *Actual Biol* v. 38 / No 104; pp. 71-79.
134. **Satish P., Mukesh K., Nag S., Dharwad R., Deependra S. (2013)** Plant Toxins: An Overview. *Research J. Pharmacology and Pharmacodynamics*; v.5 n.5 pp. 283-288.
135. **Silva R. (2012)**. El orégano (*Lippia graveolens* Shauer.) una alternativa agroindustrial para las zonas áridas y semiáridas de México. Memorias segunda reunión nacional de orégano. SIRENA. Chihuahua.
136. **Sevilla-Asencio O., Dublán- García O., Gómez- Oliván L., López- Martínez L. (2013)**. Actividad inhibitoria sobre  $\alpha$ -Glucosidasa y  $\alpha$ -Amilasa de extractos acuosos de algunas especias utilizadas en la cocina mexicana [Fecha de consulta: Disponible en:<<http://redalyc.org/articulo.oa?id=441942930006>>\_ISSN 2007-7521.
137. **Studzińska-Sroka E., Piotrowska H., Kucińska M., Murias M., Bylka W. (2016)** Cytotoxic activity of physodic acid and acetone extract from *Hypogymnia physodes* against breast cancer cell lines, *Pharmaceutical Biology*, v. 54, no.11, pp. 2480-2485.
138. **Soto A., García R., Ramírez Y., Morán J. & Serrano B. (2012)** El extracto acuoso de orégano (*Lippia graveolens* HBK) del norte de México tiene actividad antioxidante sin mostrar un efecto toxico in vitro e in vivo. *Int. J. Morphol.*, v.30, n.3 pp. 937-944.
139. **Soto-Domínguez A., García-Garza R., Ramírez-Casas Y., Moran-Martínez J., Serrano-Gallardos L. (2012)** El Extracto Acuoso de Orégano (*Lippia graveolens*

- HBK) del Norte de México Tiene Actividad Antioxidante sin Mostrar un Efecto Tóxico in vitro e in vivo. *Int. J. Morphol.*, v. 30, no. 3, pp. 937-944.
140. **Soto-García M., Rosales-Castro M. (2016)** Efecto del solvente y la relación Masa/Solvente, sobre la extracción de compuestos fenólicos y la capacidad antioxidante de extractos de corteza de *Pinus durangensis* y *Quercus sideroxylla* Maderas, ciencia y tecnología v.18, n. 4 pp. 701-714.
  141. **Stern D., Pravia M. (1999)** Manual para la preparación de composta: bases conceptuales y procedimientos, Organización Panamericana de la salud pp. 6-10.
  142. **Stolarczyk E. (2017)** Adipose tissue inflammation in obesity: a metabolic or immune response? *Current Opinion in Pharmacology*, v. 37, pp. 5–40.
  143. **Suárez Aguledo Jesús María (2012)** Tesis: Aprovechamiento de los residuos sólidos provenientes del beneficio del café, en el municipio de betania antioquia: usos y aplicaciones. Corporación Universitaria Lasallista Facultad de Ingenierías pp.38-42.
  144. **Suárez-Carmona W., Sánchez- Oliver A., González-Jurado J. (2017)** Fisiopatología de la obesidad: Perspectiva actual, *Rev Chil Nutr* v. 44, no. 3, pp. 222-234.
  145. **Suárez T., Sandoval J., Galván M., López G., Olivo D., González M., Ariza J. (2018)**. Nutracéuticos: usos potenciales en el tratamiento de la diabetes. V. 6 n.12, pp. 1-15.
  146. **Suffness M., Pezzuto J. (1990)**. Assays related to cancer drug discovery, in: Hostettmann, K. (Ed.), *Methods in Plant Biochemistry: Assay for Bioactivity*. Academic Press, London, pp.71–133.
  147. **Sumaya-Martínez M. T, Sánchez L. M, Torres G, García D (2012)** Red de valor del mango y sus desechos con base en las propiedades nutricionales y funcionales. *Revista Mexicana de Agronegocios*. Quinta Época. Año XVI, v. 30, pp.34-39.
  148. **Téllez-Monzón L., Nolazco-Cama D. (2017)** Estudio de la composición química del aceite esencial de orégano (*Origanum vulgare* spp) de Tacna Ene- Dic. Pp. 195-205.

149. **Tezara W., Coronel I., Dzib G., Calvo-Irabien L. (2013)** Relationship between photosynthetic capacity and essential oils content of *Lippia graveolens* (verbenaceae) in two location with differences in annual rainfall. *Interciencia* v. 30 no 09, pp. 669-675.
150. **Usano J. (2012)** Tesis Estudio del efecto de los factores ambientales y agronómicos sobre la producción de los aceites esenciales de *Salvia lavandulifolia* VAHL. pp. 36-42.
151. **Umesawa K., Kojima I., Simizu S., Lin Y., Nakade Y. (2018)** Therapeutic activity of plant-derived alkaloid conophylline on metabolic syndrome and neurodegenerative disease models *Human Cell* v. 31 pp.95–101.
152. **Valencia-Avilés E., Ignacio-Figueroa I., Sosa-Martínez E., Bartolomé-Camacho E., Martínez-Flores E., García-Pérez M. (2017)** Polifenoles: propiedades antioxidantes y toxicológicas *Revista de la Facultad de Ciencias Químicas* no. 16 pp. 15 22.
153. **Valenzuela A., Valenzuela R., Sanhueza J., Morales G., (2014)** Funcional foods, nutraceuticals and foshu are we going to a novel food concept? *Rev. Chilena Nutr* v41, no.2 pp. 198-203.
154. **Vega-Robledo B. (2010).** Citocinas, *Revista Facultad de Medicina UNAM* Vol. 53 No. 2 pp. 94,95.
155. **Venegas-Casanova E., Gómez-Alva A., Vázquez-Corales E. (2019)** Evaluación fitoquímica preliminar del extracto metanólico y etanólico de las flores de *Cordia lutea* Lam. (Boraginaceae) y su capacidad antioxidante, *ARNOLDA* v. 26, no. 1, pp. 359-348.
156. **Viada-Pupo E., Gómez-Robles L., Campaña-Marrero I. (2017)** ESTRÉS OXIDATIVO ISSN 1560-4381 CCM
157. **Villavicencio E.; Martínez O.; Cano A. Berlanga C. (2007).** Orégano, recurso con alto potencial. *Ciencia y Desarrollo*. 33: pp. 60-66.
158. **Vílchez H., Pineda P., Villanueva B. Laura (2018)** Actividad hipoglucemiante de los extractos de *Smallanthus sonchifolius* “yacón” y *Vitis vinífera* uva” en ratas con diabetes inducida por aloxano *Facultad de Ciencias Farmacéuticas y Bioquímica, Universidad Inca Garcilaso de la Vega. Lima, PERÚ* pp. 539-550.

159. **Vongsak B., Kongkiatpaiboon S., Jaisamut, S., Machana S., Pattarapanich, C. (2015)** In vitro alpha glucosidase inhibition and free-radical scavenging activity of propolis from Thai stingless bees in mangosteen orchard. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, v. 25, no.5, pp. 445-450.
160. **Yáñez-Chávez L., Escobar-Pedraza. J., Campos-Villarreal A., Flores-Hernández A. (2013)** Aprovechamiento del orégano (*Lippia graveolens*): producción de biomasa y rendimiento de aceite esencial extraído por el método de arrastre con vapor de agua en mapimi, dgo. *Congresos I Internacional, IX Nacional REBIZA y VI Nacional orégano y otras aromáticas...*pp. 402.
161. **Zimmet P, Alberti KG, Shaw J (2005)** Global and societal implications of the diabetes epidemic. *Nature*, v. 414 pp. 782-787.
162. **Zulet M., Pachaou V., Navarro C., Martí A., Martínez A. (2007).** Inflammatory biomarkers: the link between obesity and associated pathologies. *Nutr. Hosp.* v.22, no.5, pp. 511-527.