

Facultad de Química – Universidad de la República, Uruguay

Programa de Desarrollo de las Ciencias Básicas (PEDECIBA) Química

# Nuevas alternativas naturales para la prevención y control de enfermedades crónicas no transmisibles

Tutores: Dra. Alejandra Medrano, Dr. Luis Panizzolo, Dr. Alejandro Gugliucci

Licenciada en Bioquímica Agustina Irazusta

Tesis para acceder al título de Magíster en Química



*“Con sus palabras cobraban forma mis pensamientos, repentinamente tenía un camino  
ante mí, recorrerlo ya no me parecía imposible.”*

Susanna Tamaro

*A Teresa Piegas, mi abuela.*

## Índice general

Índice de figuras .....	V
Índice de tablas .....	VIII
Agradecimientos .....	X
Resumen.....	XI
1. Introducción .....	1
1.1 Enfermedades crónicas no transmisibles (ECNT) .....	1
1.1.1 Enfermedades cardiovasculares (ECVs).....	2
1.2 Sistemas oxidantes y antioxidantes.....	4
1.2.1 Especies reactivas del oxígeno y nitrógeno .....	4
1.2.2 Enzimas antioxidantes .....	5
1.2.3 Estrés oxidativo y sistemas oxidantes .....	6
1.3 Sistema inmune .....	9
1.3.1 Sistema inmune innato e inflamación .....	9
1.3.2 Sistema inmune adaptativo.....	14
1.4 Productos de la glicación avanzada (AGEs).....	18
1.4.1 Receptor de AGEs (RAGE).....	21
1.4.2 AGEs y salud .....	22
1.4.3 Vías de inhibición de la formación de compuestos AGEs.....	23
1.5 Aterosclerosis .....	29
1.6 Lipoproteína de alta densidad (HDL) .....	31
1.7 Fitoquímica y hierbas medicinales.....	34
1.7.1 Compuestos fitoquímicos.....	35
1.7.2 Compuestos fenólicos y regulación de la formación de AGEs.....	38
1.7.3 Hierbas medicinales de uso común en Uruguay y la región.....	39
1.8 Bioaccesibilidad y biodisponibilidad .....	41
1.8.1 Breve descripción del aparato digestivo .....	41
1.8.2 Procesos de simulación gastrointestinal .....	44
2 Objetivo.....	46
2.1 Objetivos específicos .....	46
3 Materiales y métodos.....	47

3.1	Equipos .....	47
3.2	Reactivos.....	48
3.3	Preparación de la muestra.....	48
3.4	Caracterización fisicoquímica de la materia prima .....	48
3.4.1	Contenido proteico total .....	48
3.4.2	Contenido lipídico total .....	49
3.4.3	Determinación de minerales por vía seca .....	49
3.4.4	Contenido de fibra dietética total .....	50
3.4.5	Contenido de humedad total .....	50
3.4.6	Determinación de glúcidos totales.....	51
3.5	Preparación de los extractos .....	51
3.6	Rendimiento de los extractos .....	51
3.7	Determinación del contenido de polifenoles totales .....	51
3.8	Identificación y cuantificación de compuestos fenólicos .....	52
3.9	Determinación de la actividad antioxidante.....	53
3.9.1	Frente a radicales ABTS*+ .....	53
3.9.2	Frente a radicales peroxilo (ORAC).....	53
3.10	Determinación de la actividad antiglicante.....	54
3.11	Ensayo <i>in vitro</i> de actividad anti-inflamatoria .....	55
3.12	Estudios de bioaccesibilidad .....	56
3.13	Capacidad inhibitoria de la glicación con fructosa a nivel del tracto gastrointestinal .....	56
3.14	Preparación de la HDL.....	57
3.15	Ensayos de oxidación de la HDL.....	57
3.15.1	Acercamiento al análisis estructural de la población de partículas de HDL	57
3.16	Análisis estadístico .....	58
4	Resultados y discusión .....	59
4.1	Caracterización fisicoquímica de la materia prima.....	59
4.2	Rendimiento de los extractos .....	59
4.3	Determinación del contenido de polifenoles totales .....	60
4.4	Determinación de la actividad antioxidante.....	63

4.4.1	Frente a radicales ABTS* <sup>+</sup> .....	63
4.4.2	Frente a radicales peroxilo .....	66
4.5	Identificación y cuantificación de compuestos fenólicos .....	68
4.6	Determinación de la actividad antiglicante .....	73
4.7	Ensayo <i>in vitro</i> de actividad anti-inflamatoria .....	74
4.8	Estudios de bioaccesibilidad .....	76
4.8.1	Determinación del contenido de polifenoles totales luego de la simulación digestiva .....	76
4.8.2	Determinación de la actividad antioxidante luego de la simulación digestiva .....	78
4.8.1	Identificación y cuantificación de compuestos fenólicos luego de la simulación digestiva .....	80
4.8.2	Determinación de la actividad antiglicante luego de la simulación digestiva .....	81
4.8.3	Ensayo <i>in vitro</i> de actividad anti-inflamatoria luego de la simulación digestiva .....	82
4.9	Capacidad inhibitoria de la glicación con fructosa a nivel del tracto gastrointestinal .....	84
4.10	Ensayos de oxidación de la HDL .....	86
4.10.1	Acercamiento al análisis estructural de la población de partículas de HDL	87
5	Conclusiones .....	90
6	Bibliografía .....	93

## Índice de figuras

<b>Figura 0:</b> Resumen de los resultados obtenidos en este trabajo.....	XIII
<b>Figura 1.2.1.1:</b> Generación de especies reactivas de oxígeno y nitrógeno.....	5
<b>Figura 1.2.3.1:</b> Proceso mediante el cual la molécula de AAPH genera radicales peroxilo a 37°C en medio acuoso.....	8
<b>Figura 1.2.3.2:</b> Proceso mediante el cual la molécula de SIN-1 genera radicales peroxinitrito en condiciones aerobias.....	8
<b>Figura 1.3.1.1:</b> Esquema representativo del origen de todos los elementos celulares de la sangre, incluidos los linfocitos.....	10
<b>Figura 1.3.1.2:</b> Esquema conteniendo las principales citoquinas pro-inflamatorias secretadas por macrófagos activados y sus respectivas funciones.....	12
<b>Figura 1.4.1:</b> Reacción de glicación no enzimática de proteínas.....	19
<b>Figura 1.4.2:</b> Diferentes vías de formación de compuestos AGEs.....	20
<b>Figura 1.4.3:</b> Estructuras de los diferentes tipos de AGEs.....	21
<b>Figura 1.4.2.1:</b> Representación esquemática de la formación de compuestos AGEs y sus efectos biológicos en el organismo.....	23
<b>Figura 1.4.2.1:</b> Potenciales sitios de inhibición de la formación de AGEs.....	24
<b>Figura 1.4.1.2:</b> Proceso de glicación temprana no enzimática lleva a la generación de compuestos como 2-(2-furoil)-4(5)-(2-furanil)-1H-imidasol, cuando la aminoguanidina interviene reacciona con los productos de Amadori para generar compuestos alternativos no reactivos.....	25
<b>Figura 1.5.1:</b> Fotografías de autopsia de una aorta abdominal normal.....	30
<b>Figura 1.6.1:</b> Esquema representativo de la biogénesis y metabolismo de la HDL.....	32
<b>Figura 1.6.2:</b> Principales actividades fisiológicas de la HDL conteniendo PON1.....	33

<b>Figura 1.7.1.1:</b> Principales antioxidantes en plantas medicinales.....	36
<b>Figura 1.7.1.2:</b> Proceso de formación de los AGEs y algunos compuestos fitoquímicos conocidos por inhibir la reacción de glicación en diferentes etapas.....	39
<b>Figura 1.8.1:</b> Esquema representativo del aparato digestivo y los órganos que lo componen. ....	43
<b>Figura 3.15.1.1:</b> Patrón de separación para suero de los geles de Lipoprint utilizados.	58
<b>Figura 4.3.1:</b> Concentración de polifenoles totales expresados en mg GAE/ g muestra para cada extracto en agua destilada (A) o en EtOH 95% (B).. ....	62
<b>Figura 4.4.1.1:</b> Actividad antioxidante frente a radicales ABTS <sup>•+</sup> expresados en $\mu$ moles Trolox/ g muestra para todos los extractos en agua destilada (A) o en EtOH 95% (B). .	65
<b>Figura 4.4.2.1:</b> Actividad antioxidante frente a radicales peroxilo expresados en $\mu$ moles Trolox/ g muestra para todos los extractos en agua destilada (A) o en EtOH 95% (B)..	67
<b>Figura 4.5.2:</b> Cromatogramas obtenidos para la muestra de boldo acuoso a una concentración de 5 mg/mL .....	71
<b>Figura 4.6.1:</b> Valores de IC50 obtenidos para los extractos.....	73
<b>Figura 4.7.1:</b> Porcentajes de actividad de NF- $\kappa$ B obtenidos para los extractos acuosos de menta (A), boldo (B) y carqueja (C). ....	75
<b>Figura 4.8.1.1:</b> Cromatogramas obtenidos para el extracto de boldo acuoso a una concentración de 5 mg/mL luego de haber sido sometido al proceso de simulación gastrointestinal. ....	80
<b>Figura 4.8.4.1:</b> Porcentajes de actividad de NF- $\kappa$ B obtenidos para los extractos acuosos de boldo antes y después del proceso de simulación digestiva.....	83
<b>Figura 4.9.1:</b> Valores de porcentaje de actividad antiglicante obtenidos para los sistemas incubados con boldo 5 mg/mL o aminoguanidina 4mM (AG) durante el	

proceso de simulación gastrointestinal, comparado con los que no fueron sometidos a dicho proceso.....85

**Figura 4.10.1:** Porcentajes de actividad de la PON-1 presente en la HDL cuando ésta fue incubada por 3h a 37°C con los extractos (concentración de 0,05 mg/mL) y AAPH (A) o SIN-1 (B).....86

## Índice de tablas

<b>Tabla 1.7.2.1:</b> Ensayos de actividad antioxidante clasificados según su naturaleza.....	25
<b>Tabla 3.8.1:</b> Gradiente de elución utilizado en las corridas de HPLC. ....	52
<b>Tabla 3.15.1:</b> Sistemas elaborados para cada ensayo con los volúmenes determinados para cada caso.....	57
<b>Tabla 4.1.1:</b> Resultados obtenidos de las determinaciones realizadas para la caracterización fisicoquímica en base seca de las hierbas con sus respectivas desviaciones estándar expresadas en porcentaje.....	59
<b>Tabla 4.2.1:</b> Valores de porcentaje obtenidos para el rendimiento de extracción en cada caso.....	60
<b>Tabla 4.3.1:</b> Valores de concentración de polifenoles totales obtenidos para los extractos sin aplicación de ultrasonido (US), expresados en mg GAE/g muestra.....	61
<b>Tabla 4.4.1.1:</b> Resultados obtenidos de actividad antioxidante frente a radicales ABTS <sup>•+</sup> , expresados en $\mu$ moles TE/ g muestra para los extractos sin aplicación de US..	64
<b>Tabla 4.4.2.1:</b> Resultados obtenidos de actividad antioxidante frente a radicales peroxilo, expresados en $\mu$ moles Trolox/ g muestra seca para los extractos sin aplicación de US.....	66
<b>Tabla 4.5.1:</b> Valores de concentración expresados en $\mu$ g/mL de extracto para todos los extractos.....	72
<b>Tabla 4.8.1.1:</b> Valores de concentración de polifenoles totales obtenidos para los extractos acuosos y etanólicos digeridos y sin digerir, expresados en mg ácido gálico/g muestra. ....	77
<b>Tabla 4.8.2.1.1:</b> Resultados obtenidos de actividad antioxidante frente a radicales ABTS <sup>•+</sup> para los extractos acuosos y etanólicos digeridos y sin digerir, expresados en $\mu$ moles Trolox/ g muestra. ....	78

<b>Tabla 4.8.2.2.1:</b> Resultados obtenidos de actividad antioxidante frente a radicales peroxilo para los extractos acuosos y etanólicos digeridos y sin digerir, expresados en $\mu$ moles Trolox/ g muestra. ....	79
<b>Tabla 4.8.1.1:</b> Valores de concentración expresados en $\mu$ g/mL de extracto para todos los extractos luego de haber sido sometidos al proceso de simulación gastrointestinal .....	81
<b>Tabla 4.8.3.1:</b> Valores de IC50 de los extractos expresados en $\mu$ g/mL.....	82

## Agradecimientos

En primer lugar me gustaría agradecer a mi tutora Alejandra Medrano, por abrirme las puertas de su laboratorio para la realización de esta maestría, así como por su orientación y paciencia a lo largo de este proceso. Extiendo el agradecimiento a mis cotutores: Luis Panizzolo y especialmente a Alejandro Gugliucci, el cual me recibió de la forma más cálida imaginable cuando fui por su laboratorio en Touro University a realizar una pasantía. Me gustaría también agradecer al técnico del laboratorio Russell Caccavello, que con su música hizo las mañanas de mesada más amenas que he vivido; el agradecimiento también abarca al resto del equipo de “Glycation, Oxidation and Disease” por el hermoso trato que recibí.

Agradezco mucho a mis compañeros del área Química de Alimentos: Jessica Báez, Carla Bonifacino, Daniel Acosta y Lara, Adriana Fernández, Analía Rodríguez, Cecilia Abirached, Sonia Cozzano y Santiago Jorcín, por todo lo que hemos compartido durante estos años. El agradecimiento también se dirige a mis compañeros de otras áreas dentro del Departamento de Ciencia y Tecnología de los Alimentos, los cuales también estuvieron presentes con su buena onda durante esta etapa.

Agradezco al Instituto de Investigaciones Biológicas Clemente Estable (IIBCE), por concederme el acceso al equipo con el cual hice gran parte de esta tesis. Asimismo me gustaría agradecer a Ana Hernández, Emilia Villamil y Claudio Rodríguez de la Cátedra de Inmunología del Instituto de Higiene, por ayudarme con los ensayos en células.

Agradezco enormemente al Programa de Desarrollo de las Ciencias Básicas (PEDECIBA) y a la Comisión Sectorial de Investigación Científica (CSIC) por brindarme el apoyo económico para la realización de mi maestría, así como para realizar la pasantía en EE. UU. y poder asistir a varios eventos en el exterior; y a la Comisión Académica de Posgrado (CAP) por otorgarme la beca con la que pude finalizar este proyecto.

Sin dudas que agradezco infinitamente a mi familia, en especial a mis padres Graciela y Ricardo, por apoyarme siempre en todas las decisiones que tomo. A mis hermanos Fran y Mauri por ser adorables como son. También me gustaría agradecer inmensamente a mi abuela Teresa, por siempre preguntarme como me estaba yendo con mi tesis y acceder a prender todas las velitas que le pedí que encendiera cada vez que un desafío se aproximaba, ¡cada una de ellas me ayudó un montón!

Agradezco enormemente a mis grandes amigas: Lula Curbelo, Ale Espíndola y Flor Klein por ser hermosamente receptivas, haciendo de este proceso algo menos estresante.

Otro gran agradecimiento que no puede faltar es a “los gurises”: Rodro Rossi, Martín Sosa, Agus Villarrueta, Maxi Morais, Pablo Amorín, Maxi Izzi, Juli Tejería y Nico Anichini, por todas las cervezas terapéuticas que nos hemos tomado. Agradezco también a los “mosqueteros”: Facu Tabó y Maru García, y a los integrantes de “Estampita Records”, los cuales también colaboraron con sus dosis de cervezas.

El agradecimiento del año se lo merece, sin duda alguna, mi novio Andrés Amor, que como su apellido lo indica: es puro amor. Gracias por soportarme todos estos años.

## Resumen

Las enfermedades crónicas no transmisibles (ECNT) son enfermedades no infecciosas ni contagiosas. Constituyen la principal causa de muerte tanto en Uruguay como en el mundo. Éstas incluyen: el cáncer, las enfermedades cardiovasculares (ECVs), la diabetes y las enfermedades respiratorias crónicas. Este trabajo se enfocó principalmente al estudio de la aterosclerosis, principal factor de riesgo para el desarrollo de ECVs. La aterosclerosis es una reacción inflamatoria crónica de la pared arterial, en cuyo origen y avance participan desde componentes del sistema inmune, hasta la dieta ingerida por el individuo.

Los productos de la glicación avanzada (*advanced glycation end products*, AGEs), son un grupo de compuestos grande y heterogéneo, que se originan en la reacción de Maillard. Estos compuestos juegan un rol crucial en el desarrollo de ECNT mediante los siguientes mecanismos: a) el entrecruzamiento de proteínas alterando sus funciones y propiedades; b) activación de cascadas de señalización pro-inflamatorias mediante interacción con receptores específicos, o mediante mecanismos no dependientes de receptores; c) generación de compuestos oxidantes y pro-inflamatorios.

Los compuestos fitoquímicos son compuestos bioactivos presentes en alimentos de origen vegetal. Entre éstos se encuentran los compuestos fenólicos, los cuales presentan una gran actividad antioxidante y antiglicante inhibiendo la formación de AGEs, y por ende disminuyendo el estrés oxidativo y las respuestas pro-inflamatorias. Incluso, se ha visto que algunos de estos compuestos presentan actividad anti-aterómica, manteniendo la actividad antioxidante de partículas de lipoproteína de alta densidad (HDL), al evitar la oxidación de la enzima paraoxonasa 1 (PON-1) que contienen en su superficie. Estos compuestos con propiedades bioactivas, pueden ser utilizados en la formulación de alimentos funcionales, de forma de prevenir el desarrollo de ECNT. Por lo tanto, el principal objetivo de este trabajo fue el de obtener extractos inhibidores de la formación de los mismos a partir de hierbas medicinales de uso frecuente en Uruguay (*Mentha x piperita L.*, *Baccharis trimera Less.* y *Peumus boldus Mol.*), así como evaluar las diferentes vías de formación de compuestos AGEs provocados por la dieta. Conjuntamente, se estudió su comportamiento a lo largo del tracto gastrointestinal, de forma de determinar si la bioactividad se mantiene al alcanzar el intestino.

Para efectuar este estudio, se realizaron extractos de las hierbas antes mencionadas utilizando dos solventes: agua destilada a 95°C (3 minutos) y etanol 95% a temperatura ambiente (24 horas). A su vez, se analizó la eficacia de un método de extracción alternativo (ultrasonido) a diferentes tiempos (1, 2 y 3 horas). Los resultados obtenidos demostraron en primer lugar, que la aplicación de ultrasonido no presenta diferencias significativas a la hora de extraer compuestos bioactivos, por lo que se seleccionaron los extractos en agua destilada a 95°C durante 3 minutos y en etanol 95% durante 24 horas. Todos los extractos seleccionados (figura 0), presentaron considerable

contenido de compuestos fenólicos totales, así como una gran actividad antioxidante (frente a radicales ABTS<sup>•+</sup> o peróxido), antiglicante y anti-inflamatoria, incluso luego de haber sido sometidos al proceso de simulación gastrointestinal. Se sugiere que los extractos evitan la oxidación de la PON-1 en presencia de AAPH y SIN-1, manteniendo así su actividad arilesterasa. Asimismo, parecen afectar la distribución de subclases de partículas de HDL.

En conclusión, surge de nuestros resultados que los extractos acuosos y etanólicos de las tres hierbas estudiadas, son muy buenos candidatos como fuente de compuestos fenólicos con capacidades bioactivas muy interesantes, pudiendo ser utilizados como ingredientes en alimentos funcionales.

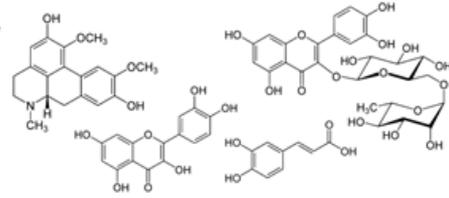
*Mentha x piperita*  
*L., Peumus boldus*  
*Mol. y Baccharis*  
*trimera* Iles.



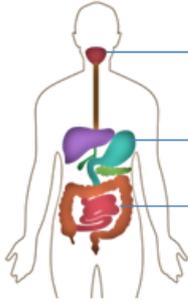
Extractos acuosos y etanólicos



Compuestos identificados y cuantificados



Simulación gastrointestinal

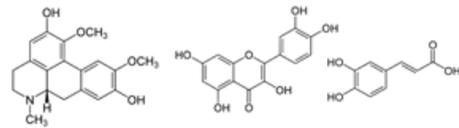


Etapa salivar

Etapa gástrica

Etapa duodenal

Todos: Considerable contenido de compuestos fenólicos

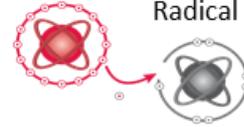


Todos: Capacidad antioxidante

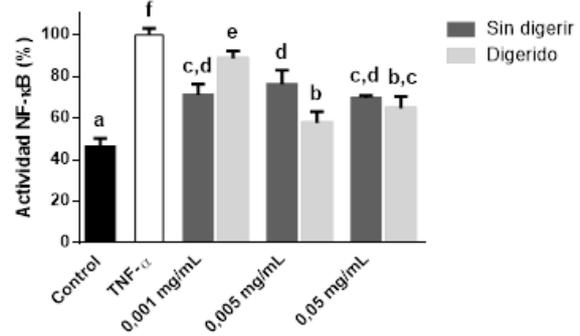
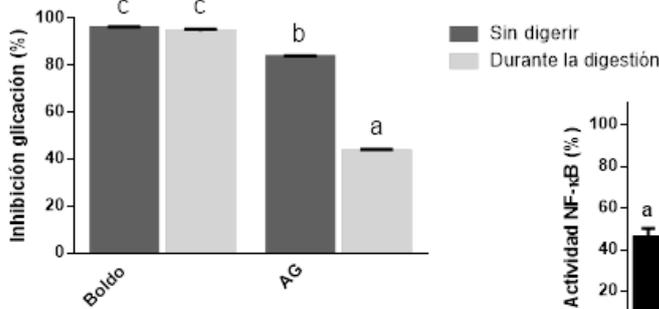
Todos: Actividad antiglicante exógena  
Boldo acuoso: también a nivel del tracto gastrointestinal

Antioxidante

Radical libre



Boldo acuoso: Actividad anti-inflamatoria



Sugieren presentar capacidad protectora contra la formación de la placa de ateroma

Todos:

1. Evitan oxidación de la proteína PON-1 en presencia de AAPH y SIN-1, manteniendo su actividad.
2. Afectan a nivel de subclases de HDL, alterando la población de partículas.

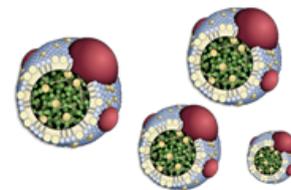


Figura 0: Resumen de los resultados obtenidos en este trabajo.

## 1. Introducción

### 1.1 Enfermedades crónicas no transmisibles (ECNT)

Las enfermedades crónicas no trasmisibles (ECNT) son enfermedades no infecciosas o no transmisibles entre personas. Son el resultado de factores genéticos, fisiológicos, ambientales y de comportamiento. Constituyen la principal causa de muerte tanto en Uruguay como en el mundo (Rosa & Sica, 2013; World Health Organization, 2018). Entre ellas se encuentran las enfermedades cardiovasculares (ECVs), causantes de la mayoría de las muertes por estas enfermedades con 17,9 millones de defunciones cada año. Le siguen el cáncer con 9 millones, las enfermedades respiratorias responsables de 3,9 millones de defunciones, y la diabetes con 1,6 millones de defunciones cada año. En total, estas enfermedades se cobran a nivel mundial aproximadamente 41 millones de vidas por año, lo que equivale al 71% de las defunciones mundiales. Éstas afectan principalmente a los países de ingresos bajos y medios, donde se registran más del 75% (32 millones) de las muertes (World Health Organization, 2018). Son un problema de gran importancia, no solo por el riesgo que conllevan para la población, sino además por los desorbitados costos que generaron en las dos últimas décadas (2010-2020) y se espera que los valores lleguen a US\$ 47 trillones de dólares (Bloom et al., 2011).

Los principales factores de riesgo del comportamiento para el desarrollo de ECNT modificables según la Organización Mundial de la Salud (OMS), son los siguientes:

- El consumo de tabaco
- Ingesta excesiva de cloruro de sodio
- Consumo de alcohol
- Actividad física insuficiente

El no corregir dichos factores, puede llevar a problemas metabólicos serios los cuales desencadenan el desarrollo de las ECNT, según la OMS estos incluyen:

- Hipertensión arterial
- Obesidad
- Hiperglucemia (concentraciones elevadas de glucosa en sangre)
- Hiperlipidemia (concentraciones elevadas de lípidos en sangre)

La OMS publicó en 2013 un plan de acción global, apuntando a la reducción de las ECNT del 2013 al 2020 (WHO, 2013), en el cual se plantean seis objetivos:

1. Elevar la prioridad en la prevención y el control de ECNT en agendas mundiales, a través de la cooperación internacional.

2. Fortalecer la capacidad nacional y las alianzas para acelerar la respuesta del país en la prevención y control de ECNT.
3. Reducir los factores de riesgo modificables para prevenir la aparición de ECNT y los determinantes sociales subyacentes a través de la creación de entornos promotores de la salud.
4. Fortalecer y orientar los sistemas de salud para abordar la prevención y control de ECNT y determinantes sociales subyacentes a través de la atención primaria centrada en la gente y la cobertura universal de salud.
5. Promover y apoyar la capacidad nacional de investigación y desarrollo de alta calidad para la prevención y control de ECNT.
6. Monitorear las tendencias y determinantes de las ECNT y evaluar el progreso en su prevención y control.

Según estudios epidemiológicos, el principal factor de riesgo en el desarrollo de enfermedades crónicas no transmisibles es la obesidad, y se ha constatado un aumento alarmante a nivel mundial de la misma (Abelson & Kennedy, 2004; Haslam & James, 2005). Como se mencionó anteriormente, dentro de las ECNT las ECVs son la mayor causa de muerte a nivel mundial (Clennin et al., 2015). En Uruguay constituyen la primera causa de mortalidad, significando el 28,1% de las muertes en el año 2012 (Ministerio de Desarrollo Social, 2015). Dado estos alarmantes datos, este trabajo se enfocó principalmente al estudio de la aterosclerosis, principal factor de riesgo para el desarrollo de ECVs (Nakano et al., 2013).

### 1.1.1 Enfermedades cardiovasculares (ECVs)

Según la OMS, las enfermedades cardiovasculares (ECVs) son un grupo de desórdenes del corazón y de los vasos sanguíneos, entre los que se incluyen:

- Cardiopatías coronarias: enfermedad de los vasos sanguíneos que irrigan el músculo cardíaco.
- Enfermedades cerebrovasculares: enfermedades de los vasos sanguíneos que irrigan el cerebro.
- Arteriopatías periféricas: enfermedades de los vasos sanguíneos que irrigan los miembros superiores e inferiores.
- Cardiopatías reumáticas: se desarrollan como resultado de la fiebre reumática (una infección de garganta mal tratada provocada por estreptococos), que culmina en daño severo de músculo cardíaco y las válvulas cardíacas en personas susceptibles genéticamente (Tekker et al., 2018).
- Cardiopatías congénitas: malformaciones del corazón presentes desde el nacimiento.

- Trombosis venosas profundas y embolias pulmonares: coágulos de sangre (trombos) en las venas de las piernas, que pueden desprenderse (émbolos) y alojarse en los vasos del corazón y los pulmones.

Desde el año 1950 se tiene conocimiento que la dieta tiene una clara relación en el desarrollo de ECVs (especialmente aterosclerosis). En aquella época, se consideraba que el mayor riesgo se originaba al consumir grandes cantidades de colesterol (Keys, 1950). Años después se planteó que el consumo de grasas saturadas en la dieta aumenta el colesterol libre en plasma y por ende el desarrollo de aterosclerosis (y posteriores ECVs), mientras que el consumo de grasas insaturadas provoca el efecto contrario (Hegsted, 2000). Un reciente comunicado emitido por la *American Heart Association* (AHA) recomienda sustituir los ácidos grasos saturados por insaturados en la dieta diaria (Sacks et al., 2017). El estudio realizado por Mori, 2017 plantea que los ácidos grasos insaturados omega 3 y 6 de origen marino, presentan un gran efecto cardio-protector, por lo que el consumo de pescado en la dieta conlleva a menores riesgos de sufrir fallas cardíacas. A su vez, se ha constatado que la reducción del consumo de sal de mesa puede llevar a una disminución en la presión arterial, lo que lleva a una mejor salud cardiovascular (Taylor et al., 2011).

Actualmente se ha demostrado, que no solo el consumo elevado de grasas saturadas puede llevar al desarrollo de ECVs, sino también el exagerado consumo de glucosa y fructosa en forma de sacarosa y jarabe de maíz de alta fructosa, presentes en bebidas azucaradas y demás alimentos procesados tiene una muy estrecha relación (Malik & Hu, 2015). La AHA también se ha pronunciado ante este hecho y recomienda una ingesta de azúcares agregados no mayor a 150 kcal/día para hombres y 100 kcal/día para mujeres (Johnson et al., 2009).

Según la OMS (y como resumen de lo planteado anteriormente), una alimentación saludable consiste en:

- Comer al menos 400 g (5 porciones) de frutas y hortalizas al día, así como legumbres, frutos secos y cereales integrales no procesados.
- Limitar el consumo de azúcares libres a menos del 10% de la ingesta calórica total lo cual equivale a 50 gramos (o unas 12 cucharaditas rasas) por día para un adulto sano.
- Limitar el consumo de grasa al 30% de la ingesta calórica diaria. Las grasas no saturadas son preferibles a las grasas saturadas.
- Limitar el consumo de sal a menos de 5 gramos al día (aproximadamente una cucharadita de café) y consumir sal yodada.

A pesar de que el riesgo de desarrollar ECVs puede disminuirse sorteando los factores de riesgo como el consumo de tabaco, las malas dietas y la obesidad, la inactividad

física o el consumo nocivo de alcohol, la prevalencia de éstas se espera que se incremente dramáticamente a 23,6 millones de muertes en 2030 (Clennin et al., 2015). Apuntar a nuevas estrategias a nivel alimentario podría ayudar considerablemente a combatir el desarrollo de este tipo de enfermedades, por ello es fundamental enfocar el conocimiento científico en el estudio de nuevas vías de prevención.

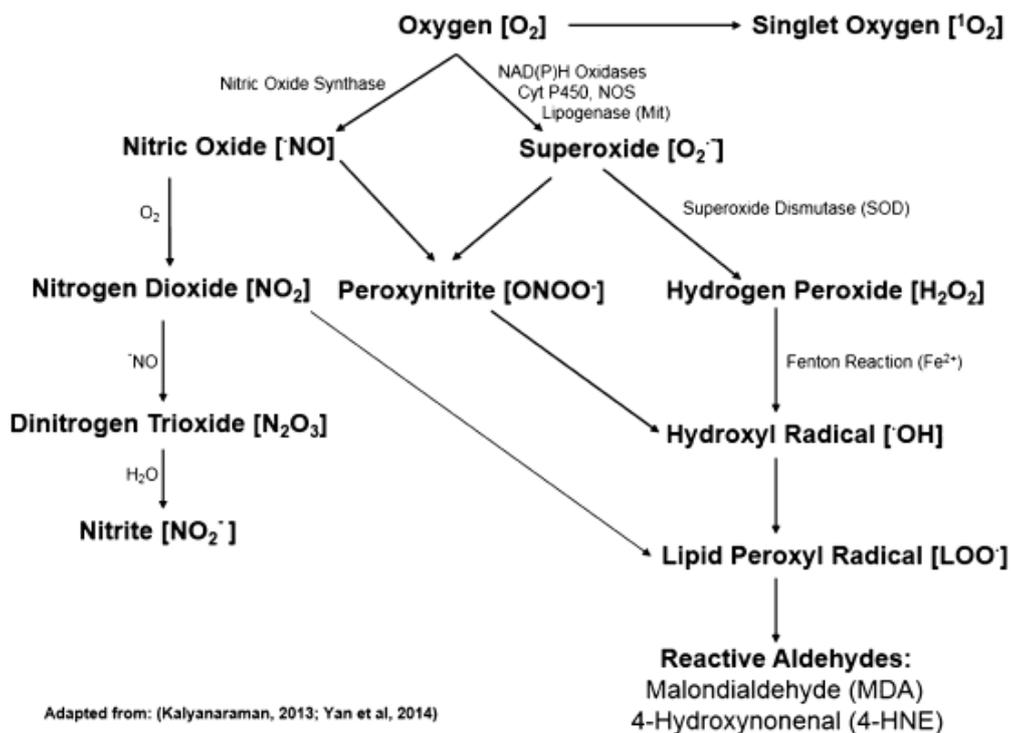
Como se mencionó anteriormente, la principal causa para el desarrollo de ECVs es la generación de aterosclerosis (Nakano et al., 2013). Ésta es una reacción inflamatoria crónica de la pared arterial en cuyo origen y avance participan muchos y variados agentes, desde componentes del sistema inmune hasta la dieta ingerida por el individuo. Para poder explicar de forma correcta el comienzo y desarrollo de esta condición es necesario introducir múltiples conceptos, fundamentales para su total comprensión. En las próximas secciones se expondrán tópicos esenciales como lo son el estrés oxidativo, el sistema inmune y los compuestos originados de la glicación avanzada (AGEs).

## 1.2 Sistemas oxidantes y antioxidantes

### 1.2.1 Especies reactivas del oxígeno y nitrógeno

En un cuadro de estrés oxidativo se originan infinidad de especies reactivas del oxígeno (*reactive oxygen species*, ROS) y del nitrógeno (*reactive nitrogen species*, RNS). Estas especies incluyen a los radicales libres, los cuales se definen como un átomo o grupo de átomos capaces de existir de forma independiente y que contienen por lo menos un electrón desapareado en el orbital más externo, lo cual los vuelve inestables y por ende muy reactivos (Halliwell & Gutteridge, 1984).

Las especies reactivas del oxígeno, son subproductos del oxígeno molecular y se originan normalmente en los procesos del metabolismo aeróbico, siendo las mitocondrias y los peroxisomas los principales generadores (Chourasia & Sethi, 2017). Participan en los procesos de destrucción de microorganismos y patógenos, así como en los de señalización intra e inter-celular. Algunas de ellas son: el radical hidroxilo ( $\cdot\text{OH}$ ), el radical anión superóxido ( $\cdot\text{O}_2$ ), el radical anión oxígeno singlete ( $^1\text{O}_2^-$ ), el radical peroxilo ( $\cdot\text{ROO}$ ), el radical óxido nítrico ( $\cdot\text{NO}$ ), el radical peroxilo lipídico ( $\cdot\text{LOO}$ ) y el radical peroxinitrato ( $\text{ONOO}^-$ ) (Ighodaro & Akinloye, 2017). La formación y naturaleza de los ROS y RNS pueden verse en la figura 1.2.1.1.



**Figura 1.2.1.1:** Generación de especies reactivas de oxígeno y nitrógeno. Figura extraída de Prior, 2015; adaptada de Kalyanaraman, 2013 y Yan et al. , 2014.

## 1.2.2 Enzimas antioxidantes

Las células cuentan con mecanismos capaces de controlar el impacto deletéreo de los ROS. Las enzimas endógenas con actividad antioxidante presentes en las células, son capaces de interactuar con los radicales libres y neutralizarlos (Reiter et al., 2001), las principales son:

- **Catalasa:** descompone el peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ) en oxígeno y agua. Existen tres tipos de catalasas: las catalasas mono-funcionales, las catalasas bi-funcionales peroxidadas, y las catalasas de manganeso. Estas metalo-enzimas evolucionaron en dos familias: las que contienen grupo hemo (tipo I), con un cofactor de hierro-porfirina; y las que no contienen grupo hemo (tipo II), las cuales presentan un sitio activo de manganeso dinuclear y son menos específicas (Grigoras, 2017).
- **Peroxirredoxinas (Prxs):** son enzimas que se encuentran en casi todas las formas de vida y utilizan tioles de cisteína para catalizar la reacción de peróxidos a agua (Ledgerwood et al., 2017). En los mamíferos hay seis tipos de Prxs, entre ellas la PrxI (citosólica) y la PrxIII (mitocondrial) son las que se expresan en mayor cantidad en todos los tipos de tejidos (Karplus, 2015).
- **Superóxido dismutasa (SOD):** dismuta el superóxido en oxígeno y peróxido de hidrógeno. Hay tres tipos de SOD en mamíferos, dos que contienen cobre/zinc las cuales son la CuZnSOD (SOD1) que se encuentra en el citosol, espacio inter-

membrana de la mitocondria y en el núcleo, y la EcSOD (SOD3) que se encuentra en el espacio extracelular. La SOD2, llamada MnSOD contiene manganeso y se localiza en la matriz mitocondrial (Griess et al., 2017).

- Glutación peroxidasa (GSH): cataliza la conjugación de la forma reducida del antioxidante glutación sobre sustratos tóxicos. Tiene la capacidad de catalizar la reacción para pasar de  $H_2O_2$  a  $H_2O$ , y de  $\cdot LOO$  a sus correspondientes alcoholes en la mitocondria y citosol. La mayoría de las veces su actividad depende del selenio como cofactor, por lo que se la considera una peroxidasa de selenocisteína (Ighodaro & Akinloye, 2017).

### 1.2.3 Estrés oxidativo y sistemas oxidantes

El estrés oxidativo se origina cuando la generación de radicales libres es de tal magnitud que los sistemas de defensa normales con que las células cuentan para protegerse no logran degradarlos en su totalidad, interactuando con macromoléculas como proteínas, glúcidos, fosfolípidos, ácidos nucleicos, alterando sus funciones (Cerdá et al., 2014; Prior, 2015; Sies & Cadenas, 1985). Si la cantidad de radicales libres es muy importante, cuando a estas especies creadas por el metabolismo del organismo se le suma los que son ingeridos con la dieta, o en forma de drogas, polución, etc., se genera daño tisular que desemboca en enfermedades varias como: patologías de tipo gastrointestinales, renales, neurológicas, endocrinas, procesos reumáticos, broncopulmonares, entre otras; siendo las más destacadas las ECNT introducidas en el apartado 1.1 (Cerdá et al., 2014; Levine & Stadtman, 2001; Mahmoudi, 2018; Valko et al., 2007).

Los procesos de oxidación e inflamación están estrechamente vinculados; la inflamación crónica está asociada con la oxidación dado que compuestos antioxidantes han logrado disminuir a ambos. Se ha visto que el estrés oxidativo desencadena respuestas inflamatorias, ciertos compuestos antioxidantes logran regular el balance redox para disminuir las respuestas celulares ante tal situación y de esta forma disminuir la inflamación (Camps & García-Heredia, 2014).

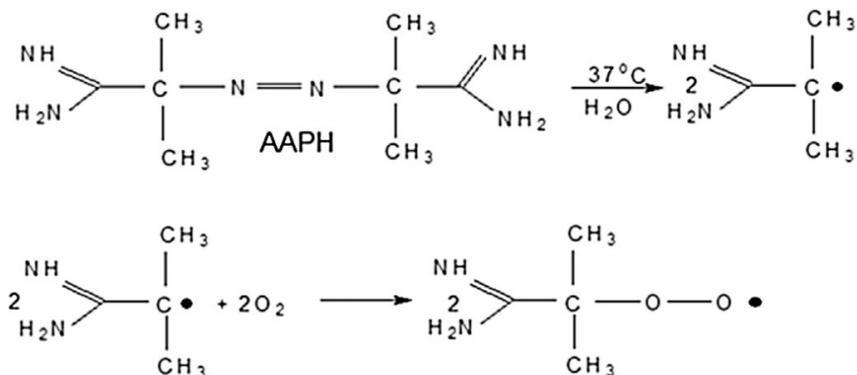
Algunas células del sistema inmune destruyen a los patógenos bacterianos fagocitándolos y segregando ROS en un proceso llamado estallido respiratorio. Estos ROS constituyen parte normal de la respuesta inflamatoria en la capa subendotelial de los vasos sanguíneos. Sin embargo, cuando esta respuesta perdura demasiado en el tiempo puede significar daño para los tejidos y el organismo en general (Bondy, 2016). A su vez, el  $O_2^-$  liberado de forma normal por las mitocondrias de las células endoteliales mediante el proceso de respiración es convertido en  $H_2O_2$  por la enzima superóxido dismutasa (SOD). El  $H_2O_2$  es una molécula estable que difunde y sirve como molécula de señalización, mas puede convertirse en radical  $\cdot OH$  el cual puede interactuar con muchas macromoléculas y de esta forma alterar su funcionamiento (Ago et al., 2011).

Las enzimas xantina oxidasa (XO) y óxido nítrico sintasa (NOS) son generadoras de ROS altamente expresadas a nivel de los tejidos. La XO existe en dos formas: xantina deshidrogenasa (XDH) y xantina oxidasa (XO), ambas son capaces de catalizar la reacción de pasaje de hipoxantina a ácido úrico, en condiciones de hipoxia sin embargo, la enzima se transforma de reductora de NAD (XDH) a productora de  $O_2^-$  (XO) (Ago et al., 2011). Con respecto a la NOS, existen varias isoformas: la NOS neuronal (nNOS), la cual es específica del sistema nervioso, la NOS inducible (iNOS), la cual se activa frente a respuestas pro-inflamatorias y agentes patógenos, se asocia principalmente a células del sistema inmune pero se vio que además se encuentra en varios tipos celulares, y la NOS endotelial (eNOS), la cual se expresa mayoritariamente en las células endoteliales. Esta última, produce  $^*NO$  usando tetrahidrobiopterina ( $BH_4$ ) como cofactor y NADPH como donante de electrones, este radical es fundamental en el proceso de vasodilatación. Cuando el estrés oxidativo aumenta, ya no hay  $BH_4$  disponible dado que se degrada, por lo que esta enzima en su defecto produce  $O_2^-$ , ayudando al aumento de ROS a nivel vascular (Ago et al., 2011).

Otra enzima endotelial productora de ROS es la NADPH oxidasa, la cual produce  $O_2^-$  transfiriendo un electrón desde NADPH (o NADH) al  $O_2$ . Se descubrieron siete tipos dentro de la familia de las NADPH oxidasas: Nox1–Nox5, Duox1 y Duox2; de las cuales Nox1, Nox2 y Nox4 están altamente expresadas en las células endoteliales de los vasos sanguíneos (Ago et al., 2011). Se ha visto que la enzima Angiotensina II es responsable de activar a la NADPH oxidasa en células del tejido vascular liso, células endoteliales y cardiomiocitos (células del músculo cardíaco) (Li & Shah, 2003). La angiotensina II es la hormona que regula la presión sanguínea y se activa mediante la cascada hormonal llamada renina-angiotensina, la cual responde a los cambios de la presión sanguínea a nivel de los riñones. Una vez que se detectan dichos cambios, las células del aparato yuxtglomerular de los riñones liberan la enzima renina (angiotensinasa) al torrente sanguíneo, la cual viaja hasta encontrarse con la enzima angiotensinógeno secretada por el hígado, transformándola en angiotensina I la cual puede aumentar la presión sanguínea a bajos niveles. La angiotensina I liberada en la sangre debe encontrarse y reaccionar con la enzima convertidora de angiotensina (ECA) producida en los pulmones, la cual reaccionará con ella para transformarla en angiotensina II. La principal función de esta enzima es la de elevar la presión sanguínea contrayendo las paredes de los vasos sanguíneos, así como promover la producción y secreción de la enzima aldosterona por las glándulas suprarrenales. Esta enzima además de presentar propiedades vaso-constrictoras, provoca que el riñón regule la filtración de sodio y agua en el torrente sanguíneo lo cual también aumenta la presión sanguínea (Sheposh, 2016b).

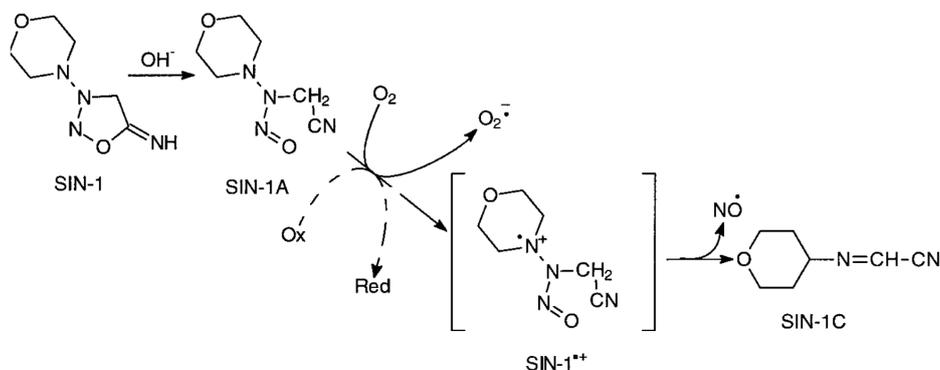
En este trabajo se utilizaron dos moléculas generadoras de radicales libres, una de ellas es el 2,2'-azobis (2-amidinopropano) dihidrocloruro (AAPH). Este compuesto tiene la capacidad de a una temperatura elevada (en el caso de este trabajo a 37°C) generar compuestos azo con la capacidad de interactuar con oxígeno (en medio acuoso), y

generar compuestos peroxilo reactivos como se indica en la figura 1.2.3.1 (Litescu et al., 2014).



**Figura 1.2.3.1:** Proceso mediante el cual la molécula de AAPH genera radicales peroxilo a 37°C en medio acuoso, imagen extraída y modificada de Litescu et al., 2014.

Otro compuesto generador de radicales libres utilizado en este trabajo es el 3-morfolino-sidnonimina (SIN-1), el cual (dependiendo de las condiciones en las que se encuentre) es capaz de generar radicales peroxinitrito u óxido nítrico. Si el compuesto se encuentra en condiciones de hipoxia (por ejemplo a nivel *in vivo*) es capaz de generar en su mayoría radical óxido nítrico, sin embargo en sistemas aerobios (*in vitro*) genera tanto radical óxido nítrico como superóxido, reaccionando entre sí y originando radicales peroxinitrito. La reacción ocurre en tres pasos ejemplificados en la figura 1.2.3.2: en primer lugar, el anillo sidnonimina se abre para dar lugar al compuesto SIN-1A, luego éste reduce el oxígeno presente en una reacción de transferencia de un electrón para dar lugar al catión SIN-1Y1, el cual se descompone para formar SIN-1C y el radical óxido nítrico (Singh et al., 1999).



**Figura 1.2.3.2:** Proceso mediante el cual la molécula de SIN-1 genera radicales peroxinitrito en condiciones aerobias, imagen extraída de Singh et al., 1999.

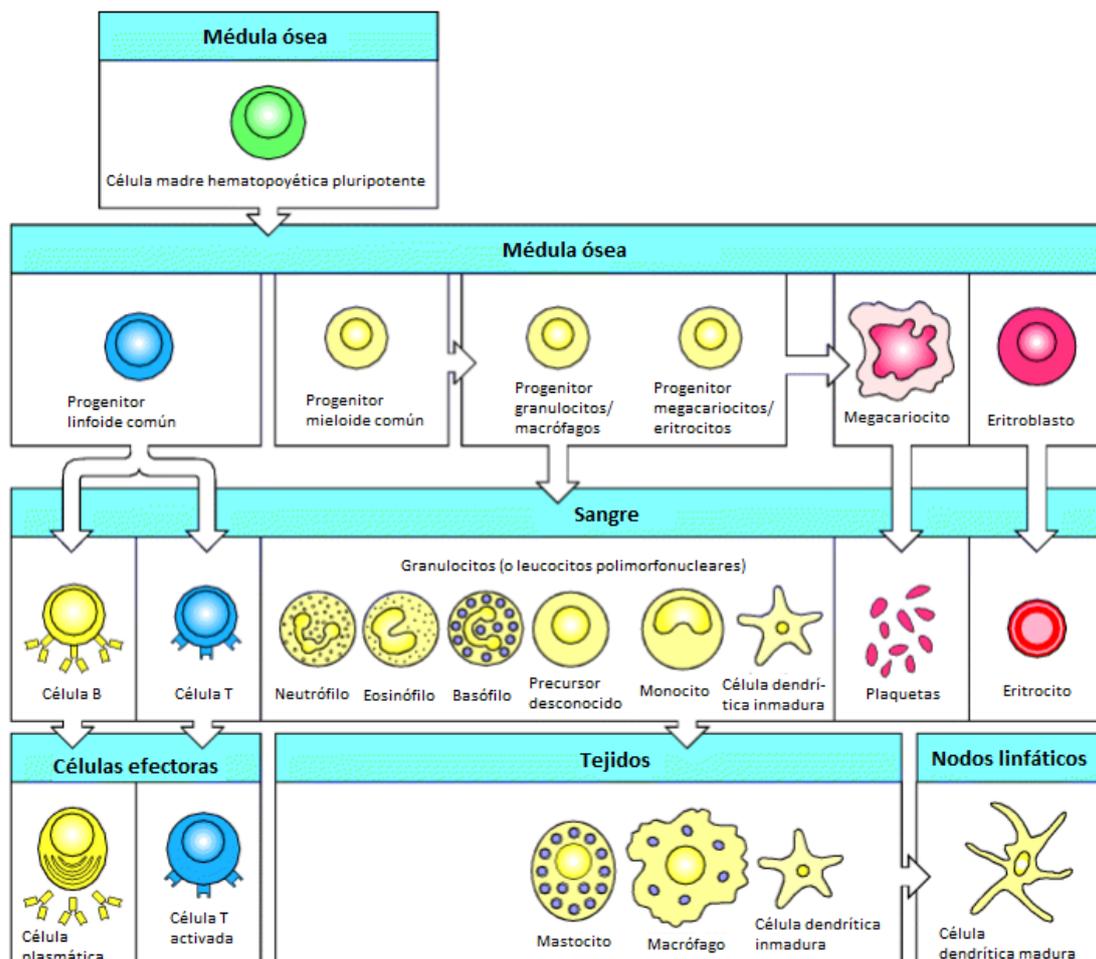
Todos estos procesos, más los sumados en un contexto de inflamación, contribuyen a la carga total de ROS a nivel de los vasos sanguíneos y en el organismo en general, contribuyendo al mantenimiento del estrés oxidativo. La próxima sección ahondará en conceptos relacionados con el sistema inmune y el proceso de inflamación.

### 1.3 Sistema inmune

#### 1.3.1 Sistema inmune innato e inflamación

El proceso de inflamación, es una respuesta normal del organismo frente a amenazas tanto externas como internas. Es el resultado del sistema inmune innato, el cual constituye la primera barrera de defensa en entrar en acción en el organismo y puede tardar desde minutos hasta horas (Hansson et al., 2002; Libby et al., 2009).

Las células pertenecientes al sistema inmune se originan en la médula ósea (de las células madre hematopoyéticas), donde la mayoría madura y luego son liberadas al torrente sanguíneo o al torrente linfático (mediante un sistema de vasos especiales) hasta llegar a los tejidos periféricos (Janeway et al., 2001). En la figura 1.3.1.1 puede observarse el linaje de las células que forman parte del sistema inmune, así como las plaquetas y los eritrocitos.



**Figura 1.3.1.1:** Esquema representativo del origen de todos los elementos celulares de la sangre, incluidos los linfocitos (pertenecientes al sistema inmune adaptativo), las plaquetas y los eritrocitos. Figura extraída de Janeway et al., 2001 y adaptada.

Las células madre hematopoyéticas pluripotentes se dividen para dar lugar a dos tipos de células madre ya más especializadas, la progenitora linfoide común y la progenitora mieloide común. Las primeras dan origen a los linfocitos B y T responsables de la respuesta inmune adaptativa, mientras que las segundas originan diferentes tipos de leucocitos (glóbulos blancos), eritrocitos (células sanguíneas transportadoras de oxígeno) y las plaquetas las cuales son fundamentales en el proceso de coagulación de la sangre (Janeway et al., 2001).

Los componentes del sistema inmune innato están constantemente examinando los tejidos periféricos en busca de señales provenientes de patógenos o daño tisular. Secretan diferentes tipos de moléculas, de forma de comunicar cual es la respuesta que se debe montar según el tipo de amenaza detectada, así como guiar a otras células al sitio de infección. Las citoquinas son proteínas secretadas por algunas células, y son capaces de afectar el comportamiento de otras células que presenten receptores para ellas. Las quimiocinas son citoquinas específicas, encargadas de atraer a determinados tipos celulares (los que presenten receptores para ellas) al sitio desde donde se secretan (mediante gradientes de concentración).

El sistema inmune cuenta con dos tipos diferentes de células para detectar y reconocer patógenos: las centinelas y otros tipos celulares. Las primeras son básicamente los macrófagos, los neutrófilos y las células dendríticas, las cuales son las encargadas de recorrer los tejidos periféricos, como se mencionó anteriormente. Tienen la capacidad de reconocer patrones del medio extracelular, presentando receptores específicos en su superficie celular, así como en las paredes de los compartimientos endosomales. Otros tipos de células del sistema inmune también presentan receptores a nivel citosólico, de forma de desencadenar apoptosis de haber sido infectadas, así como secretar citoquinas pro-inflamatorias (Rongvaux, 2018).

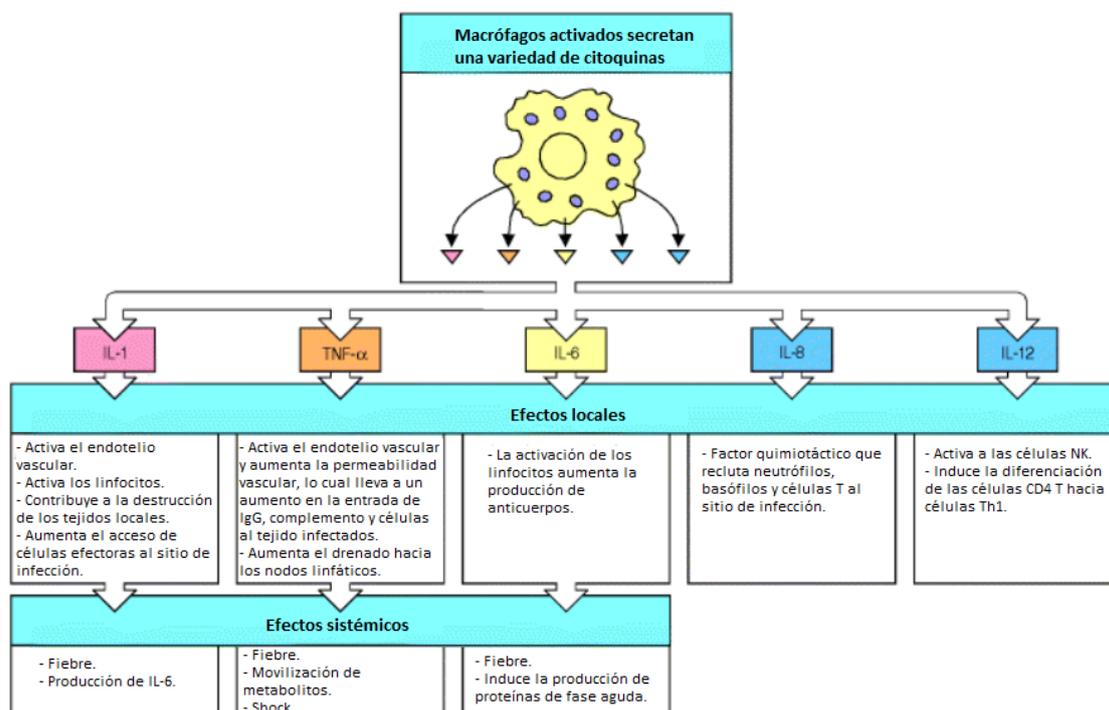
Las células que participan en el sistema inmune innato son las siguientes:

- Macrófagos: son uno de los tres tipos de células fagocíticas presentes en el sistema inmune. Cumplen el rol de transitar los tejidos periféricos en busca de patógenos. Son la forma madura de los monocitos (Janeway et al., 2001).
- Células dendríticas: son uno de los tipos celulares que unen el sistema inmune innato con el adaptativo, dado que se encargan de reconocer antígenos y presentarlos a los linfocitos en los nodos linfáticos para su reconocimiento. A nivel periférico se encuentran las células dendríticas inmaduras, las cuales examinan los tejidos fagocitando grandes cantidades de fluido extracelular, una vez que se encuentran con un patógeno lo fagocitan, maduran y migran hacia los nodos linfáticos mediante el sistema linfático (Janeway et al., 2001).

- Granulocitos: se llaman así por su citoplasma granulado, también se les llama linfocitos polimorfo-nucleares debido a sus núcleos de extrañas y variadas formas. Hay tres tipos de granulocitos:
  - Neutrófilos: son el tercer tipo celular capaz de fagocitar. Viajan a través del torrente sanguíneo detectando mediante reconocimiento de quimiocinas el lugar donde se encuentra el foco de infección y migrando hacia allí mediante diapédesis (pasaje entre células endoteliales). Estas células pueden producir y liberar especies reactivas de oxígeno, tales como radicales superóxido y peróxido de hidrógeno para matar a los patógenos (Sheposh, 2016a).
  - Eosinófilos: participan principalmente en las infecciones parasitarias y en la modulación hacia las reacciones de hipersensibilidad Tipo I (alergias). Una vez en el sitio de infección son capaces de producir proteínas granulosas, especies reactivas de oxígeno (peroxidasa), eicosanoides y prostaglandinas (producen calambres y dolor), factores de crecimiento y citoquinas (McBroom, 2015).
  - Basófilos: son células involucradas en las reacciones alérgicas. Presentan inmunoglobulinas tipo E (IgE) unidas a receptores de membrana específicos (Ogulur et al., 2017).
- Mastocitos: son células grandes que contienen gránulos citoplasmáticos cargados de histamina y demás mediadores químicos, liberados una vez que llegan al foco de infección. La liberación de estas moléculas genera más permeabilidad de los vasos sanguíneos, facilitando la llegada de más células (Janeway et al., 2001).
- Células *natural killer* (NK): son células que circulan en el torrente sanguíneo como linfocitos grandes con gránulos citotóxicos distintivos. Son capaces de reconocer y matar células infectadas (anormales) por lo que son fundamentales a la hora de combatir patógenos intracelulares (Janeway et al., 2001). Tienen origen linfoide como los linfocitos B y T pertenecientes a la inmunidad adaptativa, pero son considerados parte de la inmunidad innata.

El sistema inmune innato monta una respuesta defensiva una vez que patógenos (como bacterias, virus, etc.) logran penetrar la superficie epitelial del cuerpo y ciertos patrones presentes en estos microorganismos son reconocidos por las células circulantes. Éstas cuentan con receptores especiales capaces de reconocer patrones específicos (*pattern-recognition receptors*, PRR), particularmente los que reconocen patrones de patógenos (*pathogen-associated molecular patterns* o PAMPS) así como de daño tisular (*damage-associated molecular patterns* o DAMPS). Este tipo de receptores abarcan a los receptores tipo *Toll* (*Toll-like receptors*, TLRs), los de tipo lectina C, los receptores genéticos inducibles por ácido retinoico y los receptores tipo dominio de oligomerización de unión a nucleótidos (Rojas et al., 2014). Los fragmentos

de patógenos reconocidos por el sistema inmune se llaman antígenos. Una vez que dichos antígenos se asocian a estos receptores, se desencadena una cascada compleja de señalización intracelular, la cual estimula la secreción de moléculas pro-inflamatorias (citoquinas) así como otros mediadores de inflamación (Janeway et al., 2001; Libby et al., 2009). Las principales citoquinas involucradas en los procesos de respuesta pro-inflamatoria son interleucinas. El nombre interleucina (IL) seguido por un número se estableció como forma de estandarizar una nomenclatura para las moléculas secretadas por y con acción sobre leucocitos. Sin embargo, esta nomenclatura se volvió confusa a medida que se fueron describiendo más y más citoquinas con estructuras, actividades y orígenes diferentes. Si bien se sigue utilizando, se espera que se desarrolle una nueva basada en las estructuras moleculares (Janeway et al., 2001). En la figura 1.3.1.2 se resumen las principales citoquinas pro-inflamatorias secretadas por macrófagos al enfrentarse a agentes patógenos, así como sus correspondientes funciones.



**Figura 1.3.1.2:** Esquema conteniendo las principales citoquinas pro-inflamatorias secretadas por macrófagos activados y sus respectivas funciones. Extraído de Janeway et al., 2001 y adaptado.

Una vez que los macrófagos se activan, proceden a fagocitar al agente extraño y a su vez comienzan la secreción de las citoquinas y también quimiocinas. Esta secreción de quimiocinas por parte de los macrófagos atrae a otros tipos celulares como los neutrófilos, monocitos y demás células del sistema inmune circulantes en sangre (Janeway et al., 2001).

Otro grupo de moléculas estrechamente vinculadas con la respuesta inflamatoria son las prostaglandinas (PGs). Éstas pertenecen a una subclase de eicosanoides y existen dos tipos: los prostaciclopentanos y tromboxanos (TX). Son moléculas de 20 carbonos conteniendo un anillo de ciclo-pentano (5-carbonos). Los prostaciclopentanos se clasifican según la estructura de su anillo ciclo-pentano usando letras de la A a la K, y según el número de dobles enlaces en sus estructuras de hidrocarburo; los tromboxanos se dividen en TXA y B. Las PGs, los tromboxanos, las lipoxinas y los leucotrienos se generan a partir del ácido araquidónico (AA), producido a partir de fosfolípidos en respuesta a los estímulos pro-inflamatorios (citoquinas y demás agentes pro-inflamatorios) (Seo & Oh, 2017). La cadena de síntesis de las PGs ocurre dentro de la célula, donde la enzima citoplasmática fosfolipasa A2 cataliza la reacción de pasaje de los fosfolípidos de membrana a AA. Luego, la enzima ciclooxygenasa (1 y 2) se encarga de transformar ese AA a endoperóxidos de prostaglandina. En el siguiente paso, la enzima tromboxano sintasa transforma dichos endoperóxidos de prostaglandina en tromboxano A2 (Sala et al., 2016). Las PGs participan en los procesos de coagulación sanguínea y secreción de ácido gástrico, pero la actividad que las hace importantes en un contexto inflamatorio es su capacidad vasodilatadora, dilatando directamente los vasos sanguíneos y por ende reduciendo la presión sanguínea (Campbell, 2017).

Esta estimulación de las células inmunes frente a patógenos desencadena un montón de reacciones en su interior las cuales son responsables de la secreción de moléculas como las citoquinas y las quimiocinas, principalmente se activa la cascada de señalización de NF- $\kappa$ B, la cual activa la transcripción de genes que codifican para estos tipos de moléculas. El factor de transcripción NF- $\kappa$ B (factor nuclear potenciador de las cadenas ligeras kappa de las células B activadas) es un complejo proteico capaz de activar la transcripción del ADN frente a estímulos de estrés. Esta cascada es considerada como prototípica en la señalización pro-inflamatoria. NF- $\kappa$ B está presente en el citoplasma acoplado a su proteína inhibidora (I $\kappa$ B), que bloquea su translocación hacia el núcleo. Bajo determinados estímulos (especialmente frente a IL-1 y TNF- $\alpha$ ), I $\kappa$ B se fosforila y degrada permitiendo al dímero NF- $\kappa$ B translocarse dentro del núcleo activando la transcripción de genes involucrados en la respuesta pro-inflamatoria, lo que culmina en la producción y liberación de más citoquinas, quimiocinas y moléculas de adhesión (Lawrence, 2009; Tak et al., 2001). La activación de NF- $\kappa$ B también desencadena la expresión de los genes que codifican para iNOS, lo que aumenta la producción de  $\cdot$ NO a nivel vascular, y causa la relajación del músculo liso, vasodilatación e hipotensión (Hansson et al., 2002). A su vez, cuando la infección es causada por bacterias, se activa el sistema del complemento sobre ellas con el objetivo de eliminarlas. El complemento es un sistema de proteínas del plasma sanguíneo que activa reacciones proteolíticas en cascada sobre las superficies celulares bacterianas donde las “marcan” para su fagocitosis por los macrófagos (Janeway et al., 2001).

Este proceso iniciado por las células centinela da comienzo al proceso de inflamación, el cual es promovido también por la activación del complemento ya que se secretan citoquinas pro-inflamatorias durante el proceso. La inflamación se define mediante cuatro palabras: calor, dolor, rubor e hinchazón. La dilatación y aumento de la permeabilidad vascular generada en la zona (principalmente por los mastocitos allí presentes), aumenta el flujo sanguíneo y linfático en las inmediaciones lo cual amplifica el arribo y la acumulación de células específicas, esto ocasiona el calor, el rubor y la hinchazón del foco infeccioso. Esta migración celular facilitada por las citoquinas y fragmentos del complemento genera también dolor (Janeway et al., 2001). Todas estas reacciones apuntan a la destrucción de los patógenos causantes de infección.

### 1.3.2 Sistema inmune adaptativo

El sistema inmune adaptativo surgió más tarde a lo largo de la evolución y es una respuesta inmune patógeno-específica, reconociendo estructuras determinadas del patógeno en cuestión. Gracias a esto, es una respuesta que requiere “educación” y tarda más tiempo en aparecer, desde semanas hasta meses (Libby et al., 2009).

En una respuesta del sistema inmune adaptativo, el antígeno es reconocido por dos tipos de moléculas muy variables lo cual activa los dos principales tipos celulares involucrados: los receptores de inmunoglobulina unidas a las células B y los receptores específicos de las células T (ver figura 2). Se ha visto que la presencia de un receptor de membrana sobre los precursores linfoides comunes llamado Notch1 promueve la diferenciación de células T mientras que la ausencia del mismo promueve la proliferación de la línea de linfocitos B (Maillard et al., 2005). Los linfocitos B son llamados así porque provienen de la médula ósea (*bone marrow*, en inglés), y las células T se llaman así porque provienen del timo. Luego del encuentro con un antígeno, las células B se diferencian a células secretoras de anticuerpos mientras que las células T se diferencian en células efectoras citotóxicas capaces de matar células infectadas, y en células T que activan a otras células B y macrófagos. Las células B y T que todavía no se han enfrentado ante un antígeno se llaman linfocitos *naive*. Estos están continuamente circulando del torrente sanguíneo a los tejidos linfoides periféricos, luego vuelven a la sangre mediante los vasos linfáticos o a través del bazo. Los linfocitos que han reconocido la presencia de una infección, sin embargo, son retenidos en los tejidos linfáticos donde proliferan y se diferencian a células efectoras (Janeway et al., 2001).

La gran unión entre el sistema inmune innato y adaptativo se da gracias a las células presentadoras de antígeno (CPA), especialmente las células dendríticas. Una vez que las CPA presentes en la zona de infección lograron internalizar mediante fagocitosis al patógeno y procesarlo, se activan expresando fragmentos de éste en su superficie celular mediante moléculas específicas llamadas complejos mayores de histocompatibilidad (*major histocompatibility complex*, MHC). Estas moléculas de

membrana unen fragmentos peptídicos del antígeno para ser exhibido sobre la superficie de las CPA para ser reconocidas por las correspondientes células T. Hay dos tipos de MCH, los de clase I y clase II, los cuales unen proteínas degradadas en diferentes partes de la célula. Las MHC de clase I unen péptidos de proteínas del citosol degradadas en el retículo endoplásmico provenientes principalmente de virus, mientras que las de clase II unen péptidos de proteínas degradadas en el sistema vesicular de los macrófagos y células dendríticas inmaduras provenientes principalmente de bacterias (Janeway et al., 2001). Las CPA más importantes son las células dendríticas maduras, las cuales además de presentar el antígeno unido a los MHC expresan otras moléculas de superficie llamadas co-estimulantes. Éstas migran a través del sistema linfático hasta los nodos linfáticos donde presentan los antígenos a las células T inmaduras presentes allí. Si las células dendríticas fallan en activarse, generan una respuesta tolerante hacia ese antígeno. Otro tipo celular que puede actuar como CPA son los macrófagos, una vez fagocitado el antígeno pueden activarse expresando moléculas de superficie co-estimulantes y moléculas MHC de clase II. A su vez, las células B también pueden servir como CPA en ciertos casos (Janeway et al., 2001).

Una vez en los tejidos linfáticos se da la presentación del antígeno y activación del linfocito, el cual da origen a clones de células antígeno-específicas que median la respuesta adaptativa. El mecanismo de reconocimiento de antígenos posibilita el reconocimiento de casi infinitos patrones, lo que hace que la respuesta sea mucho más específica. Los linfocitos inmaduros que entran en el torrente sanguíneo tienen receptores de antígenos específicos, determinado por un mecanismo genético que opera mientras éste madura en la médula ósea (B) y timo (T) para generar millones de variantes de genes que codifican para esas moléculas. Si bien cada linfocito tiene un receptor específico, entre ellos son diferentes, lo cual hace que sean millones de células capaces de reconocer diferentes patrones que durante la vida de la persona, sufren selección natural y solo sobreviven los que efectivamente lograron reconocer el antígeno frente a una infección. Esta teoría se llama selección clonal. A su vez, si estos linfocitos son potencialmente auto-reactivos (reconocen patrones propios del cuerpo) son removidos antes de que finalicen su maduración mediante el proceso llamado eliminación clonal (Janeway et al., 2001).

Con respecto a las células T, existen dos clases principales: una de ellas al activarse se diferencian en células T citotóxicas (CD8+) las cuales se encargan de destruir a células del organismo que han sido infectadas por virus, mientras que las otras al activarse se diferencian en células T cooperadoras (CD4+) capaces de activar otras células, como células B o macrófagos. El receptor de las células T (TCR, *T-cell antigen receptor*) está relacionado con las inmunoglobulinas pero es diferente, dado que está adaptado a patógenos específicos (Janeway et al., 2001). Las células CD4+ pueden madurar hacia diferentes fenotipos según el tipo de patógeno que sea y el ambiente de citoquinas presentes en la zona de infección. Los principales fenotipos son Th1 (promueven la

inmunidad protectora contra patógenos intracelulares matando células infectadas), Th2 (respuesta inmune humoral activando a las células B, importantes frente a las infecciones parasitarias) y Th17 (promueven inmunidad contra hongos y bacterias, promueven las enfermedades autoinmunes e inflamatorias) (Dong & Martinez, 2010). Otros tipos de linfocitos existentes son los T de memoria, centrales y efectoras. Los primeros residen en los órganos linfoides secundarios, proliferando y diferenciándose ante la presencia de antígenos previamente detectados por el sistema inmune. Secretan IL-2, CD40L, IL-4, IFN- $\gamma$  e IL-17A. Los segundos residen en los tejidos periféricos y secretan rápidamente citoquinas pro-inflamatorias (Dong & Martinez, 2010).

El otro tipo celular fundamental en la respuesta inmune adaptativa son las células B. Éstas completan su desarrollo en la médula ósea como se mencionó anteriormente, bajo influencia de la IL-7. Presentan un receptor de membrana llamado BCR (*B-cell antigen receptor*), el cual es un anticuerpo unido a la membrana que luego al madurar se excreta como anticuerpo libre. Se dividen básicamente en dos grupos:

- **B1**: producen IgM sérica e IL-10 sin necesidad de estimulación antigénica. Son linfocitos B maduros, de mayor tamaño y complejidad que los convencionales y se ubican en las cavidades peritoneal y pleural. Son células que no se someten al proceso de hipermutación somática (Merino & Gruppi, 2006; Prieto Martín et al., 2013).
- **B2**: son las células B convencionales. Se activan en presencia de antígeno, sufren hipermutación somática y maduran hacia plasmocitos secretores de anticuerpos o células de memoria, las cuales responden automáticamente a antígenos que el organismo se ha enfrentado previamente (Prieto Martín et al., 2013).

Los anticuerpos se conocen como inmunoglobulinas (Ig). La molécula de anticuerpo secretada por células B maduras (células plasmáticas) son moléculas con forma de Y que constan de tres partes iguales unidas por zonas flexibles. Los brazos de la Y tienen en la punta regiones variables (V) que son las de unión al antígeno, mientras que el tallo de la Y es una región constante (C) que interactúa con células efectoras y moléculas. Existen 5 tipos diferentes de anticuerpos: IgM, IgD, IgG, IgA, e IgE que se distinguen por su región C, siendo la IgG la más abundante a nivel de plasma sanguíneo (Janeway et al., 2001).

La función principal de los anticuerpos es la de unir antígenos para facilitar su remoción del organismo, esto lo hacen uniéndose a patrones de polisacáridos y proteínas de los antígenos llamados epítopes. Estas moléculas, a su vez, sufren re-arreglos en su estructura una vez que las células B se encuentran con un antígeno y maduran, esta reestructuración mediante edición de los genes se llama hipermutación somática y aumenta notoriamente su especificidad (Janeway et al., 2001). Las

funciones de los anticuerpos son principalmente tres: la neutralización, opsonización y activación de la cascada del complemento. La primera trata de la neutralización específica de las toxinas secretadas por la bacteria o fragmentos virales, impidiendo que estos logren causar daño al tejido. La opsonización se refiere al “marcaje” de la bacteria mediante la unión de las partes V de los anticuerpos a patrones específicos de su superficie, lo que lleva al reconocimiento de la parte C de los mismos por células fagocíticas como los macrófagos lo que lleva a su fagocitosis. La activación del complemento se da también por la interacción de la parte C de anticuerpos determinados capaces de desencadenar la respuesta de las proteínas del complemento, lo que lleva a la lisis celular y posterior fagocitosis de la misma (Janeway et al., 2001). A su vez, cada tipo de inmunoglobulina presenta características y actividades determinadas según el isotipo:

- **IgM**: es la más abundante a nivel de plasma sanguíneo y se encuentran en forma de pentámero o hexámero unidos mediante un péptido llamado cadena J. También pueden encontrarse en forma monomérica unidas a las membranas de las células B, funcionando como BCR. Constituye el primer isotipo de inmunoglobulina expresado por las células B durante su desarrollo por lo que es la primera Ig en responder ante un antígeno. Está vinculada a la primera línea de defensa del organismo ya que tiene la capacidad de activar la cascada proteica del complemento frente a infecciones (Flaherty, 2012; Janeway et al., 2001).
- **IgG**: al igual que IgM también se encuentra a nivel plasmático pero como monómero. Se divide en cuatro subclases: IgG1, IgG2, IgG3 y IgG4, las cuales se diferencian principalmente por peso molecular y en su capacidad para activar la cascada proteica del complemento (Flaherty, 2012).
- **IgA**: se encuentra principalmente en secreciones corporales y forma parte del sistema inmune de las mucosas. Se encuentra en forma de dímero unido mediante cadena J (Flaherty, 2012).
- **IgD**: se encuentra en forma de monómero unida a las superficies de las células B o libre en el plasma sanguíneo. Las células B secretoras de este tipo de anticuerpo son aquellas que escaparon a la selección clonal y por ende producen anticuerpos auto-reactivos. Este isotipo de Ig reacciona con componentes normales del organismo y son asociados con las enfermedades autoinmunes (Flaherty, 2012).
- **IgE**: son estructuralmente similares a la IgG, son los principales mediadores de las reacciones alérgicas como el asma, la urticaria y rinitis (Flaherty, 2012).

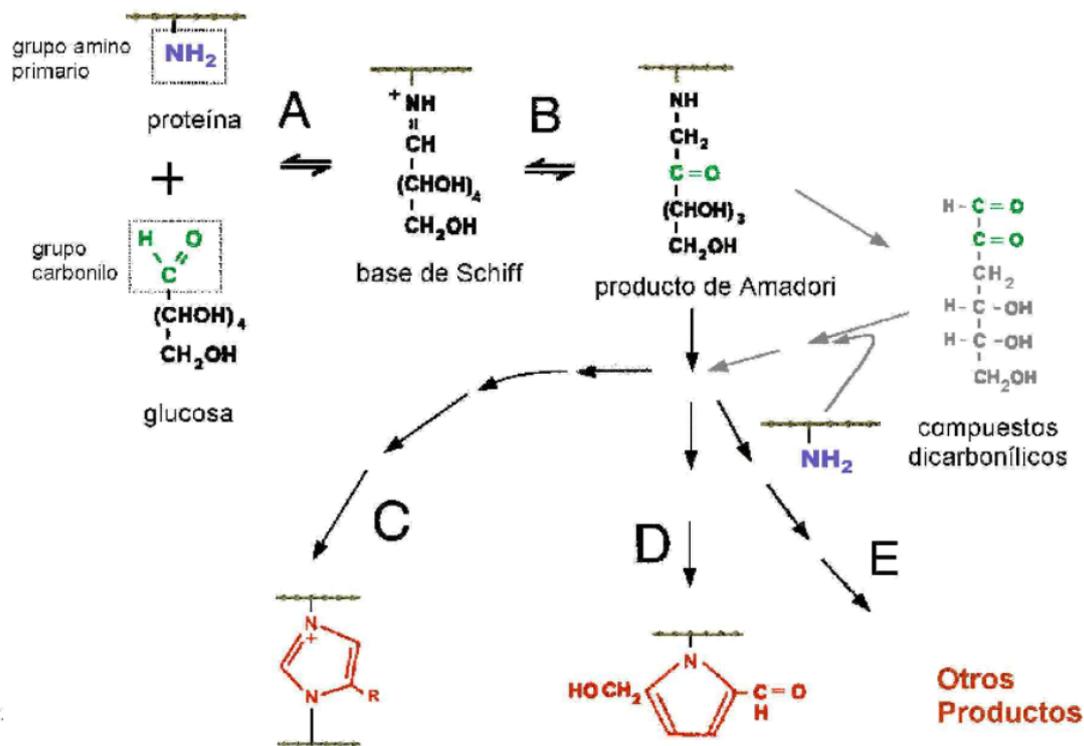
Compuestos ingeridos con la dieta son capaces de activar cadenas de señalización pro-inflamatorias como la NF- $\kappa$ B, generando condiciones de inflamación y estrés oxidativo críticas en el organismo, dando origen a múltiples enfermedades, entre ellas las ECNT

(Chinchansure et al., 2015). Los productos de la glicación avanzada (*advanced glycation end products*, AGEs) son un grupo de compuestos capaces de generar dichos efectos, por lo que en los siguientes apartados se explicará su naturaleza, efectos sobre la salud humana y posibles vías de inhibición de la formación de los mismos.

#### **1.4 Productos de la glicación avanzada (AGEs)**

Los productos de la glicación avanzada (*advanced glycation end products*, AGEs), son un grupo de compuestos grande y heterogéneo, que se originan de la reacción denominada reacción de Maillard. Comienza con la glicación espontánea entre azúcares reductores y grupos amino de moléculas como aminoácidos libres, ácidos nucleicos, péptidos y proteínas, los cuales producen compuestos primarios llamados productos de Amadori, en los que posteriormente se producen eventos complejos tales como ciclación, deshidratación, oxidación, condensación, entrecruzado y polimerización para formar productos químicos irreversibles, denominados productos de Maillard o AGEs.

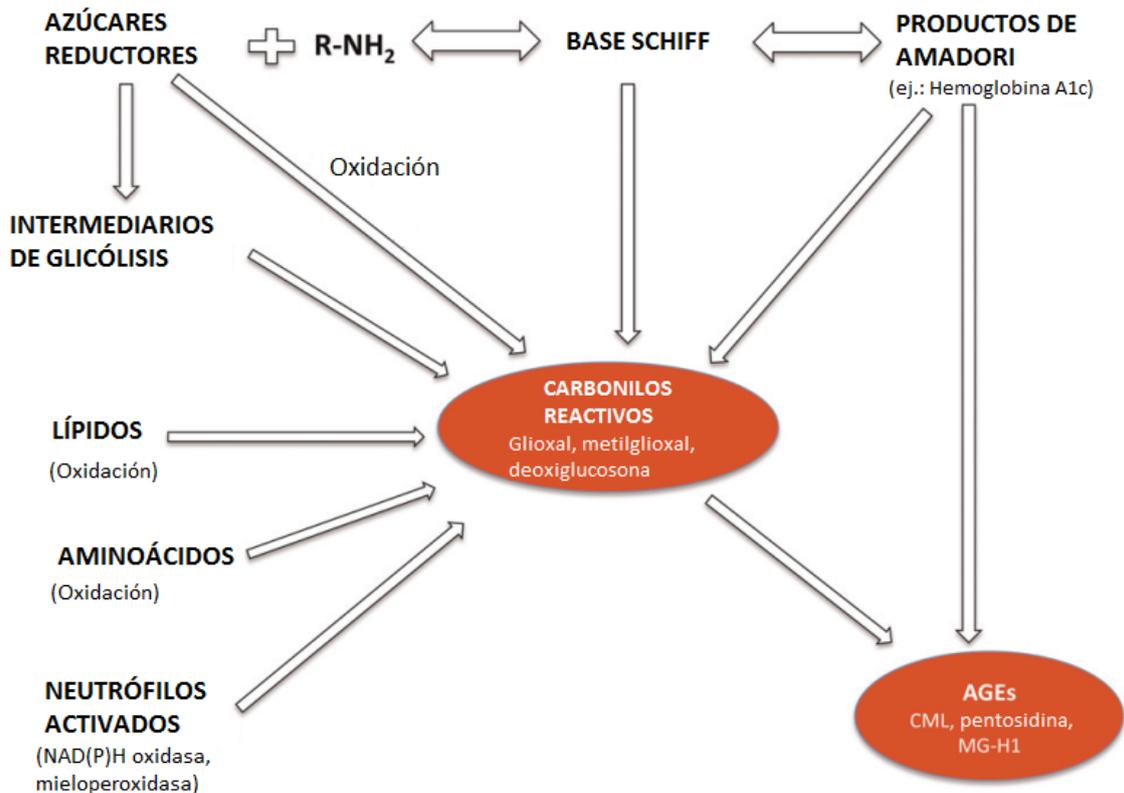
La reacción de Maillard es deseada a nivel culinario dado que mediante la aplicación de calor se generan compuestos parcialmente deseados como lo son las melanoidinas, que le brindan color amarronado a los alimentos horneados, tostados y fritos, así como compuestos volátiles que brindan aromas y sabores característicos. Sin embargo, estos compuestos son capaces de provocar sabor amargo si son generados en exceso, así como brindar inestabilidad al alimento una vez almacenado debido a que generan compuestos reductores y oxidantes que provocan desestabilización oxidativa. A su vez, esta compleja reacción provoca la pérdida de aminoácidos esenciales como por ejemplo la lisina, así como la unión cruzada de proteínas que cumple un rol importante en el desarrollo de las complicaciones de la diabetes (Technology, Procedure, & View, 2014). En la figura 1.4.1 se ilustra la reacción no enzimática de glicación de proteínas.



PRODUCTOS DE GLUCOSILACION AVANZADA

**Figura 1.4.1:** Reacción de glicosilación no enzimática de proteínas donde se indica la formación de las bases de Schiff (A), el reordenamiento de Amadori (B) y los diferentes compuestos producto que pueden presentar estructuras imidazólicas (C), pírrólicas (C) y otras como iminas, furanos, piridinas, etc. (E). Figura extraída de González Flecha et al., 2000.

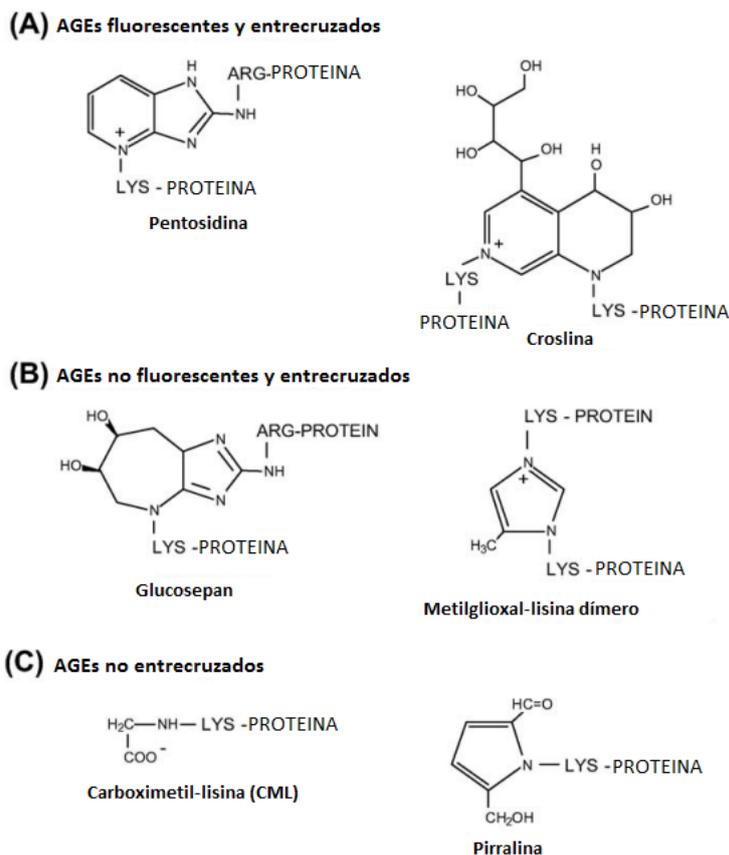
Los AGEs también pueden ser generados por otras reacciones como la oxidación de azúcares, lípidos y aminoácidos, los cuales forman aldehídos reactivos capaces de unir proteínas (Bengmark & Gil Hernández, 2007; Uribarri et al., 2015). Durante el proceso de glicosilación temprana se reduce el oxígeno lo que genera radicales superóxido. En este proceso también se genera peróxido de hidrógeno y radicales hidróxilo, los cuales juegan un rol importante en el desarrollo de patologías como las ECNT (Mullarkey et al., 1990). Asimismo, los neutrófilos al secretar compuestos oxidantes durante el estallido respiratorio también provocan la generación de un ambiente oxidante lo que favorece la formación de compuestos AGEs (Uribarri et al., 2015). En la figura 1.4.2 se muestran las principales reacciones responsables de la creación de compuestos AGEs.



**Figura 1.4.2:** Diferentes vías de formación de compuestos AGEs. Se ilustra los pasos mediante la vía no enzimática o reacción de Maillard, así como la formación de AGEs mediante otras vías alternativas. Figura extraída de Uribarri et al., 2015 y adaptada.

Los AGEs son un grupo heterogéneo, por lo que abarca compuestos con características bastantes diferentes. Incluyen aductos, marrones y fluorescentes como la pentosidina, o aductos no fluorescentes como el metilglioxal-lisina dímero, así como también aductos no fluorescentes y no entrecruzados como la carboximetil-lisina (Sharma et al., 2015).

El metilglioxal ( $\text{CH}_3\text{-CO-::CHO}$ ) es el principal dicarbonilo intracelular reactivo originado de la glicólisis. Interacciona con grupos de lisina libres y forma AGEs como la carboximetil-lisina (CML) o el dímero de metilglioxal lisina (MOLD, su sigla en inglés). También reacciona con arginina originando grupos capaces de generar hidroimidazolones (Peyroux & Sternberg, 2006). En la figura 1.4.3 se presentan las estructuras correspondientes a cada tipo de AGE.



**Figura 1.4.3:** Estructuras de los diferentes tipos de AGEs, figura extraída y adaptada de Peyroux & Sternberg, 2006.

Debido a su heterogeneidad, diferentes métodos analíticos son empleados para su detección tanto en alimentos como en muestras biológicas. Los métodos más comunes son instrumentales o inmunológicos, los primeros pueden ser mediante HPLC (*High Performance Liquid Chromatography*) acoplado a un detector de arreglo de diodos (DAD) o un detector de fluorescencia, o puede ser acoplado a un espectrómetro de masas; a su vez también se puede utilizar un cromatógrafo de gases (GC) acoplado a un espectrómetro de masas. Los inmunológicos involucran el análisis mediante ELISA (*Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay*) (Sharma et al., 2015).

#### 1.4.1 Receptor de AGEs (RAGE)

Uno de los receptores de AGEs mejor estudiado es el RAGE (*receptor for advanced glycation end products*). Este receptor es una proteína transmembrana de paso único tipo I, pertenece a la superfamilia de las inmunoglobulinas y es capaz de reconocer un amplio rango de patrones, entre los que se incluyen los AGEs, los ácidos nucleicos, las fibrillas amiloides, la proteína de cromatina HMGB1 (*high mobility group box 1*), la integrina de leucocito Mac-1, la calgranulina S100 y el LDL modificado (Uribarri et al., 2015). El RAGE es un PRR y se expresa de forma normal a nivel de tejidos y vasos sanguíneos, así como en infinidad de células del sistema inmune, como neutrófilos,

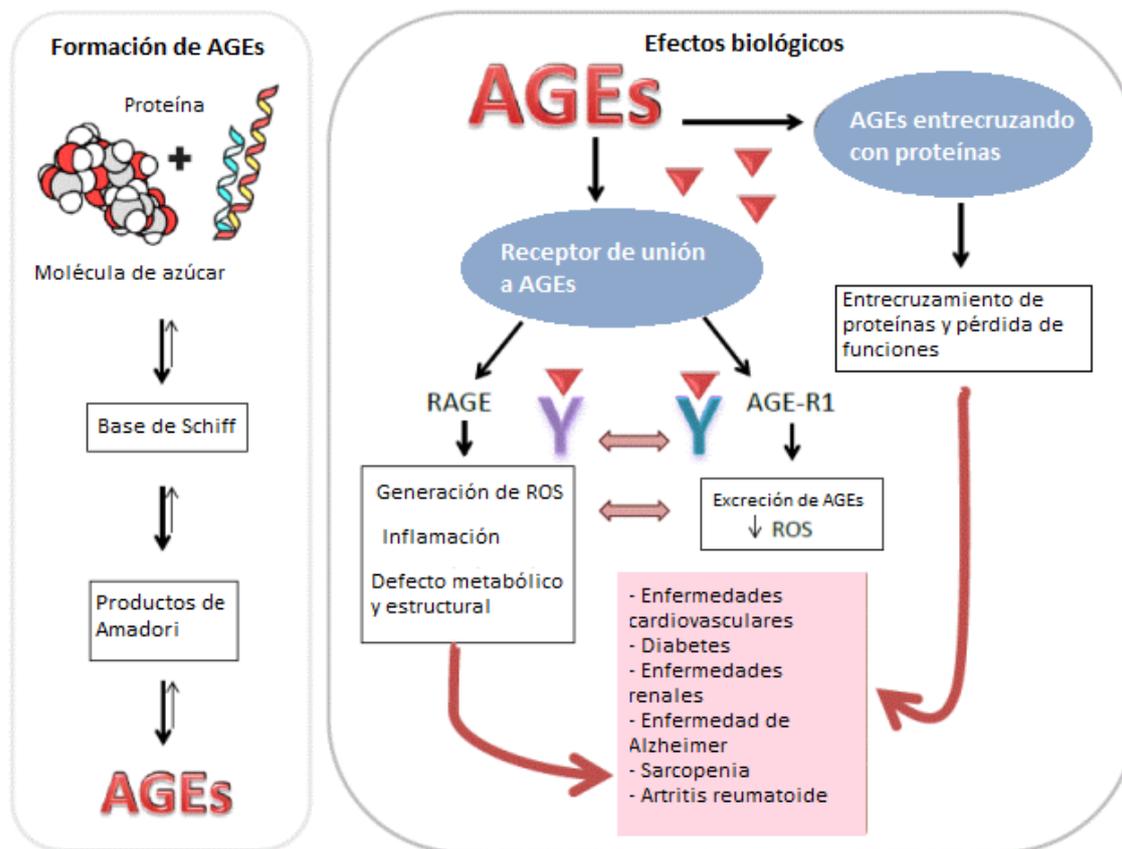
monocitos-macrófagos, linfocitos, células dendríticas y células T reguladoras. Sin embargo, su expresión se ve exacerbada cuando hay abundancia de ligandos a nivel sistémico observado en estados patológicos (Rojas et al., 2010). Se ha visto que este receptor tiene una gran relevancia en la inflamación y estrés oxidativo (dado que también reconoce citoquinas pro-inflamatorias), activando directamente la cadena de señalización del factor de transcripción NF- $\kappa$ B mediante la activación de la cadena de señalización de MAP (*mitogen-activated protein*) quinasa, desencadenando y perpetuando una respuesta de tipo pro-inflamatoria (Bierhaus & Nawroth, 2009; Peyroux & Sternberg, 2006). Se ha probado que la activación de la cascada de señalización pro-inflamatoria que vincula al factor NF- $\kappa$ B tiene estrecha relación con el desarrollo de múltiples enfermedades entre las que se encuentran la artritis reumatoide, enfermedad inflamatoria intestinal, asma, enfermedad pulmonar obstructiva crónica, así como varias enfermedades inflamatorias (Atamas et al., 2013; Holgate, 2004; Tak & Firestein, 2001; Williams et al., 2007). Asimismo, se vio que esta respuesta pro-inflamatoria juega además un importante rol en el desarrollo de la aterosclerosis (Monaco et al., 2004).

Se ha estudiado que también puede haber formación endógena de compuestos AGEs a nivel del intestino (enFruAGEs), debido a un excesivo consumo de fructosa (por ejemplo: jarabes para endulzar bebidas, etc.); y pueden ser capaces de migrar hasta los pulmones (muy ricos en RAGE) y relacionarse con el desarrollo de enfermedades respiratorias (DeChristopher et al., 2015). Estos compuestos actúan en el organismo provocando un aumento en la producción de especies reactivas del oxígeno y citoquinas pro-inflamatorias (Hofmann et al., 1999; Hori et al., 1995), lo cual lleva al desarrollo de enfermedades como las ECNT.

#### 1.4.2 AGEs y salud

Según Uribarri et al., 2015 y Peyroux & Sternberg, 2006 los mecanismos por los cuales los AGEs ocasionan el desarrollo de enfermedades son: ocasionar el entrecruzamiento de proteínas alterando sus funciones y propiedades; y activar cascadas de señalización pro-inflamatorias mediante interacción con receptores específicos para este tipo de estructuras o mediante mecanismos no dependientes de receptores, generando compuestos oxidantes y pro-inflamatorios (Figura 1.4.2.1).

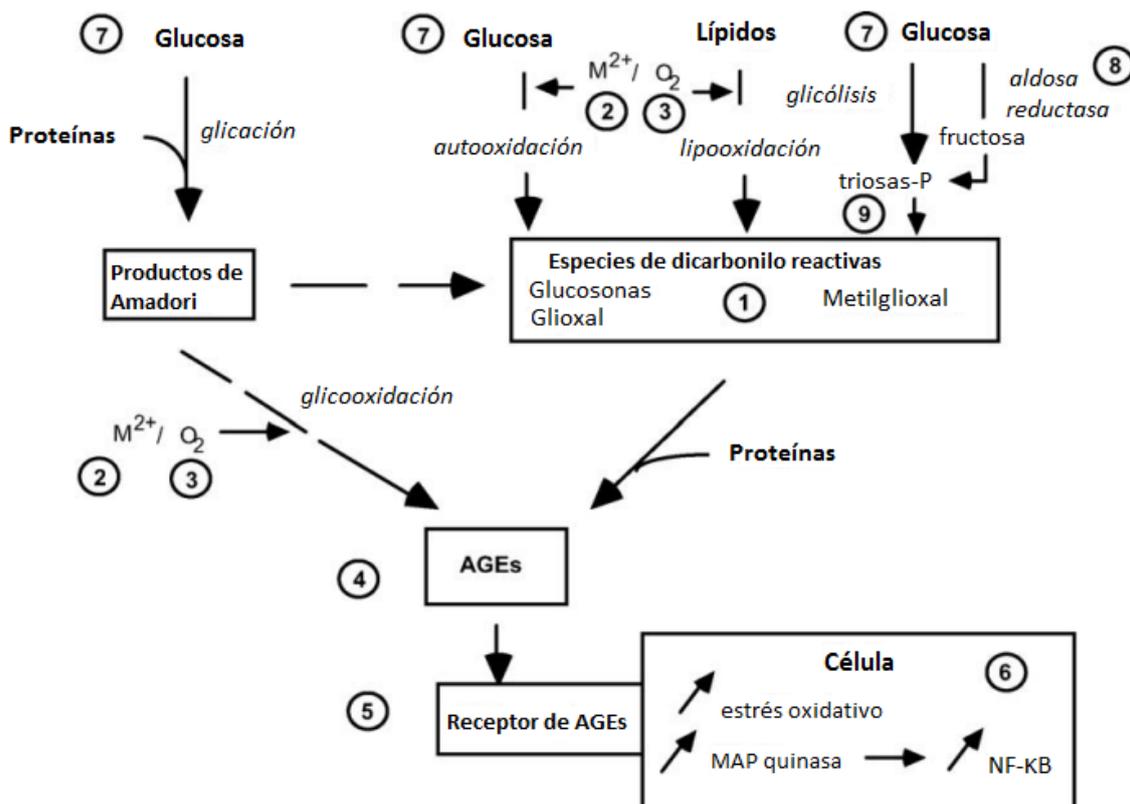
Se ha comprobado que los AGEs que se ingieren con la dieta hacen una contribución fundamental a la carga total sistémica de AGEs en el organismo, y de esta forma predispone a los individuos al estrés oxidativo e inflamación, los cuales juegan un rol crucial en el desarrollo de enfermedades crónicas no transmisibles (Uribarri et al., 2015).



**Figura 1.4.2.1:** Representación esquemática de la formación de compuestos AGEs y sus efectos biológicos en el organismo. Figura extraída y adaptada de Abate et al., 2015.

### 1.4.3 Vías de inhibición de la formación de compuestos AGEs

Debido a la importancia que tienen los AGEs en el desarrollo de enfermedades, es necesario estudiar la formación de los mismos y sus posibles sitios de control. Dentro de los potenciales sitios de inhibición de la formación de AGEs, encontramos: la captura de especies dicarbonilo reactivas, la quelación de metales de transición, la actividad antioxidante de barrido de radicales libres, la escisión de AGEs entrecruzados, el bloqueo de receptores para AGEs (RAGE), bloqueando la cadena de señalización activada por el receptor de AGEs (RAGE), reduciendo la cantidad de glucosa disponible, inhibiendo la acción de la aldosa reductasa, o derivando las triosas-P hacia la vía pentosa-P por activación de la transcetolasa (Peyroux & Sternberg, 2006). La inhibición de cualquiera de estos sitios, podría disminuir los efectos negativos que estos compuestos generan en el organismo (Figura 1.4.2.1).

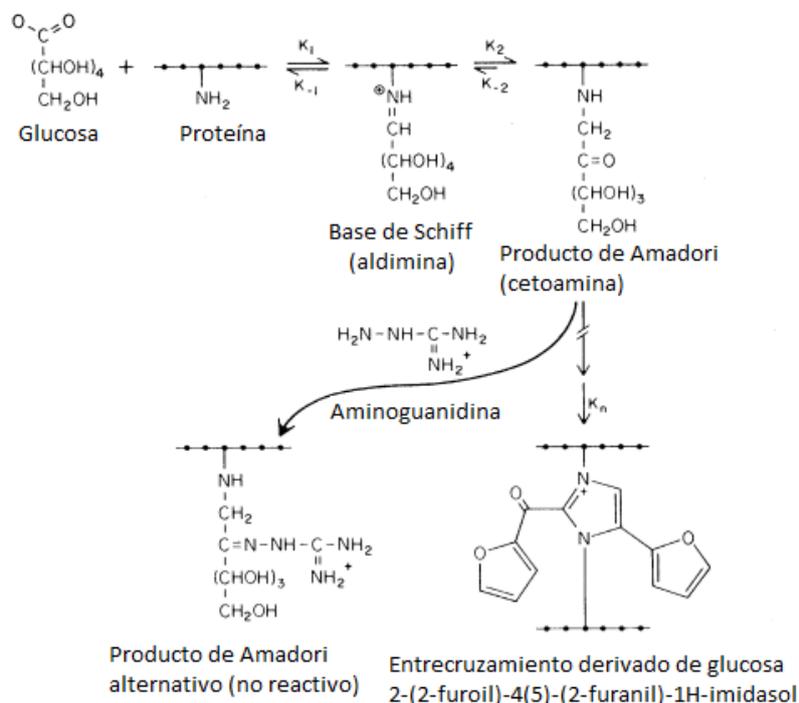


**Figura 1.4.2.1:** Potenciales sitios de inhibición de la formación de AGEs: capturando de especies dicarbonilo reactivas (1), actividad antioxidante quelando metales de transición (2), actividad antioxidante de barrido de radicales libres (3), escindiendo los AGEs entrecruzados (4), bloqueando los receptores para AGEs (RAGE) (5), bloqueando la cadena de señalización activada por el receptor de AGEs (RAGE) (6), reduciendo la cantidad de glucosa disponible (7), inhibiendo la acción de la aldosa reductasa (8), derivando las triosas-P hacia la vía pentosa-P por activación de la transcetolasa (9). Figura extraída y adaptada de Peyroux & Sternberg, 2006.

### 1.4.3.1 Captura de especies dicarbonilo reactivas

Los compuestos con actividad antiglicante capaz de capturar especies dicarbonilo reactivas (figura 1.4.2.1, 1) son de suma importancia para reducir la formación de AGEs presentes en el organismo. Según Lo et al., 2011 los compuestos que presentan mayor actividad de este tipo frente a metilglioxal son los que presentan en su estructura anillos bencénicos con tres grupos hidroxilo. La estrategia de captura de especies dicarbonilo para crear productos de Amadori alternativos no reactivos fue planteada por primera vez por Brownlee et al., 1986. En la figura 1.4.2.2 extraída y adaptada del mismo estudio se detalla como ocurre este proceso de captación de compuestos reactivos por parte de un derivado nucleófilo de hidracina llamado aminoguanidina (AG). Las pruebas clínicas de este fármaco se dividieron en dos: la primera fase, en la cual se testeó en pacientes con diabetes tipo I, llamado *Aminoguanidine Clinical Trial in Overt Type 1 Diabetic Nephropathy* (ACTION I). En esta primera instancia se evaluó la eficacia y seguridad de la AG en retardar el progreso de la lesión renal en pacientes con

nefropatía diabética. Para ambos análisis, el 33% de los pacientes se sortearon aleatoriamente como placebo, y el 67% se dividieron en dos grupos a los que se les suministró dos diferentes concentraciones de AG, la baja (50-300 mg/día) y la alta (100-600 mg/día). En la primera etapa participaron 1700 pacientes, las conclusiones extraídas fueron que los grupos a los que se les suministró la AG presentaron niveles más bajos de LDL, triglicéridos, colesterol y proteínas a nivel de orina (Thornalley, 2003). Sin embargo, numerosos efectos secundarios llevaron a cancelar la segunda parte de las pruebas clínicas sobre pacientes con diabetes tipo II llamada *Aminoguanidine Clinical Trial in Overt Type 2 Diabetic Nephropathy* (ACTION II). Éstos fueron alteraciones gastrointestinales, anormalidades en ensayos de funcionalidad hepática, síntomas similares a los de la gripe y vasculitis (Thornalley, 2003). A su vez, el hecho que a concentraciones altas este compuesto pueda interactuar con otros compuestos carbonilo, que en condiciones fisiológicas pueda interactuar con piruvato para formar un aducto de hidrazona (Peyroux & Sternberg, 2006), y que inhiba a la enzima NOS (con mayor intensidad a la inducible que a la neuronal y endotelial) (Corbett et al., 1992), también desestimularon la continuación de las pruebas clínicas.



**Figura 1.4.1.2:** Proceso de glicación temprana no enzimática lleva a la generación de compuestos como 2-(2-furoil)-4(5)-(2-furanil)-1H-imidasol, cuando la aminoguanidina interviene reacciona con los productos de Amadori para generar compuestos alternativos no reactivos. Figura extraída y adaptada de Brownlee et al., 1986.

Se han postulado varias moléculas sintéticas alternativas al uso de la AG, entre ellas destacan el cloruro de N-fenacil-4,5-dimetiltiazolio (ALT-711) (que descompone los

AGEs), ácidos carboxamido-fenoxy-isobutíricos y ácidos benzoicos (inhiben glicación temprana), piridoxamina (presenta actividad antioxidante quelando iones metálicos), benfotiamina (inhibe expresión de la aldosa reductasa), lisozima (favorece la eliminación de AGEs con la orina), y varios compuestos más (Peyroux & Sternberg, 2006). Algunas de ellas, como la metformina, ácido acetilsalicílico, diclofenaco etc., si bien fueron aprobados por la *Food and Drug Administration* (organismo de contralor estadounidense), no resultan ser lo suficientemente eficientes a la hora de inhibir el proceso de glicación en condiciones de hiperglicemia, y por lo tanto su acción contra el desarrollo de la diabetes resulta pobre (Rasheed et al., 2018). Por estas razones, la búsqueda de compuestos capaces de lograr una inhibición en la formación de AGEs como lo logra la AG pero con menor cantidad de efectos secundarios es un tema de interés en la actualidad.

#### 1.4.3.2 Presencia de actividad antioxidante

La inhibición del efecto deletéreo de los compuestos AGEs puede también verse favorecida en presencia de compuestos que presenten actividad antioxidante (figura 1.4.2.1, 2 y 3) capaces de reducir el ambiente oxidante. El agente antioxidante al reaccionar con el radical libre le cede un electrón (o acepta un hidrogenión) oxidándose y, a su vez, transformándose en un radical libre débil no tóxico (Zulueta et al., 2009). Hay dos principales categorías de antioxidantes según su mecanismo de acción: los primarios y los secundarios. Los antioxidantes primarios, interrumpen la reacción en cadena de oxidación del radical libre donando electrones o átomos de hidrógeno de los grupos fenólicos, evitando de esta forma la propagación de la auto-oxidación. Los secundarios, desactivan el oxígeno singulete, quelan iones metálicos, absorben radiación ultravioleta, barren oxígeno y ayudan a regenerar los antioxidantes primarios (Namal Senanayake, 2013).

Los compuestos que presentan este tipo de actividad cuentan con grupos cíclicos en su estructura, así como dobles enlaces y grupos hidroxilo en menor proporción. Siguiendo este razonamiento, los flavonoles presentan más actividad que las flavonas, y éstas presentan mayor actividad que las iso-flavonas (Matsuda et al., 2003). Por lo tanto, los compuestos fenólicos, compuestos nitrogenados, vitaminas, terpenoides entre otros metabolitos presentan considerable actividad antioxidante (Cai et al., 2003; Kamiloglu et al., 2014; Karadeniz et al., 2015; Miliauskas et al., 2004; Ozkan et al., 2016; Zheng & Wang, 2001). Dado que el interés por determinar la actividad antioxidante de matrices alimentarias ha cobrado mayor interés a lo largo del tiempo, varios métodos han sido desarrollados con este fin. Los principales métodos para medir la actividad antioxidante se clasifican en dos grandes grupos: los de transferencia de átomos de hidrógeno (1) y los de transferencia electrónica (2) (Huang et al., 2005; Munin & Edwards-Lévy, 2011).



Los primeros ensayos se basan en una reacción competitiva entre el agente antioxidante y el sustrato por los radicales peroxilo, originados de la descomposición térmica de compuestos azoicos (1). Mientras que los segundos, constan de la reducción de un oxidante que cambia de color cuando se reduce, siendo la medida de este color lo que determina la actividad antioxidante de la muestra (2) (Zulueta et al., 2009). En la tabla 1.7.2.1 se presentan los diferentes métodos de determinación de actividad antioxidante clasificados según su naturaleza.

**Tabla 1.7.2.1:** Ensayos de actividad antioxidante clasificados según su naturaleza, tabla extraída de Prior, 2015.

<b>HAT</b>
ORAC (oxygen radical absorbance capacity)
TRAP (total radical trapping antioxidant parameter)
Ensayo de blanqueo de crocina (carotenoide)
IOU (inhibited oxygen uptake)
Inhibición de la oxidación del ácido linoleico
Inhibición de la oxidación inducida de la LDL
<b>ET</b>
TEAC (Trolox equivalent antioxidant capacity)
FRAP (ferric ion reducing antioxidant parameter)
DPPH (diphenyl-1-picrylhydrazyl radical)
CUPRAC (Copper (II) reducing power)
ABTS (2,2-Azinobis, 3-ethylbenzthiazoline-6-sulphonic acid radical)

Para el análisis de los extractos obtenidos en este trabajo, se seleccionaron los métodos ABTS (ET), y ORAC (HAT), por lo que al realizar ambos ensayos se obtienen resultados de dos tipos diferentes de actividad antioxidante que puede presentar la muestra en estudio. El uso de antioxidantes naturales en la neutralización de los radicales libres (por su actividad de barrido) es un tema de importancia debido a sus grandes beneficios para la salud, pudiéndose emplear como ingredientes funcionales en alimentos (Miliauskas et al., 2004).

#### **1.4.3.3 Escisión de AGEs entrecruzados (AGE breakers)**

Otra forma de inhibir la formación de compuestos AGEs es mediante la escisión de los AGEs entrecruzados (figura 1.4.2.1, 4). Para ello se estudian los compuestos llamados *AGE breakers*, lo que en inglés significa “rompedor de AGEs”. Si bien se conocen varios compuestos capaces de inhibir la formación de AGEs en el organismo tanto de roedores como de seres humanos, no se sabe con certeza que se dé mediante este proceso (Peyroux & Sternberg, 2006). El compuesto conocido como ALT-711 y mencionado en el apartado 1.4.2.1 es el que se maneja como fármaco actualmente, sin embargo su efectividad contra el desarrollo de nefropatía diabética está en evaluación (Goh et al., 2008). Numerosos otros fármacos se analizaron a lo largo del

tiempo (sorbiniol, ponalrestat y epalrestat), pero ninguno de ellos resultó ser lo suficientemente efectivo como para generar una disminución considerable de AGEs tal que pueda ser aplicado en tratamientos contra la nefropatía diabética (Peyroux & Sternberg, 2006).

#### **1.4.3.4 Bloqueo de receptor RAGE y cadenas de señalización activadas por receptores de AGEs**

Este proceso involucra el atrapar a los AGEs antes de que logren llegar a receptores, inhibir la interacción del AGE con el receptor e inhibir la cascada de señalización desencadenada por la estimulación del receptor por compuestos AGE (figura 1.4.2.1, 5 y 6). La forma truncada y soluble del mismo receptor RAGE llamada sRAGE, se utiliza para capturar ligandos AGEs, y se ha demostrado que en ratones presenta un efecto supresor sobre la aterosclerosis desarrollada por los animales (Bucciarelli et al., 2002). Las células del epitelio vascular secretan un tipo de RAGE llamado esRAGE (*endogenous secretory RAGE*) el cual captura AGEs circulantes provocando efectos positivos sobre la salud de pacientes con hipertensión, artritis reumatoide e insuficiencia renal (Peyroux & Sternberg, 2006).

Se ha constatado que el bloqueo del receptor RAGE puede llevarse a cabo mediante el uso de anticuerpos anti-RAGE, permitiendo la excreción de estos compuestos a nivel urinario (Peyroux & Sternberg, 2006).

La cerivastatina y la curcumina inhiben la señal de transducción iniciada por la interacción AGE-receptor. En ensayos *in vitro* se ha comprobado que logran inhibir completamente la inducción de NF- $\kappa$ B por parte de estos compuestos (Okamoto et al., 2002).

#### **1.4.3.5 Disminución de la glucosa disponible**

La disminución de la glucosa circulante disponible en el organismo es otra forma de inhibir la formación de compuestos AGEs (figura 1.4.2.1, 7, 8 y 9), y puede lograrse disminuyendo su consumo y adquiriendo una dieta balanceada. Asimismo, bajo condiciones de hiperglucemia, el exceso de la misma se metaboliza hacia sorbitol mediante la vía de los polioles (Cruz Hernández et al., 2011), lo cual puede dar como resultado fructosa que conduce a la formación de metilglioxal y 3-desoxiglucosona (Peyroux & Sternberg, 2006).

El establecimiento de un estado de inflamación y estrés oxidativo crónicos por la ingesta y desarrollo de compuestos AGEs lleva al progreso de múltiples patologías, entre ellas la aterosclerosis, pilar fundamental para el desarrollo de diversas enfermedades cardiovasculares.

## 1.5 Aterosclerosis

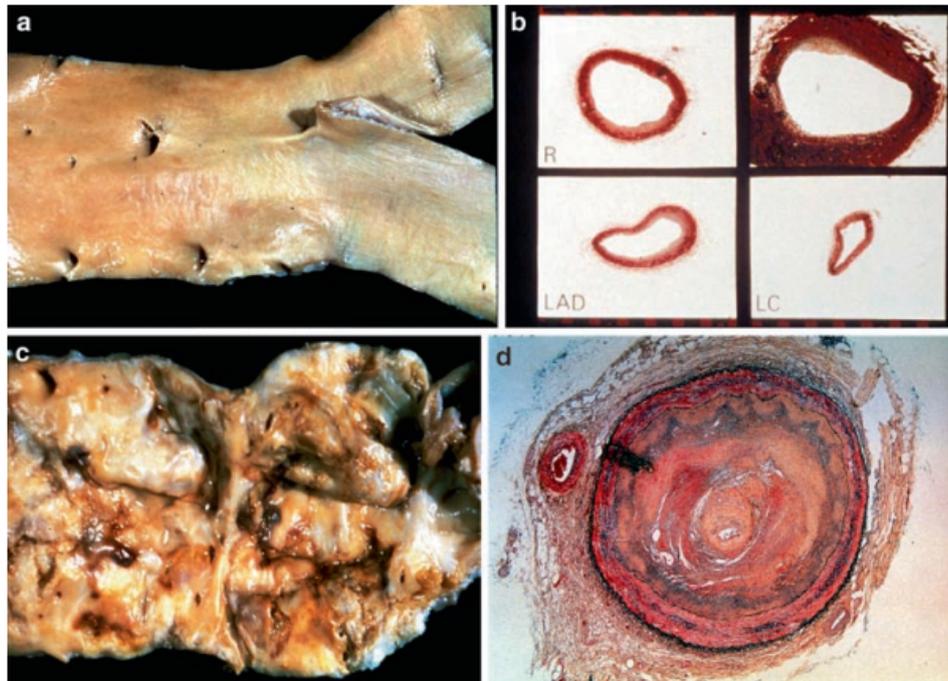
La aterosclerosis representa la primera causa de desarrollo de ECVs (Nakano et al., 2013). Es una reacción inflamatoria crónica de la pared arterial que se cree causa el desarrollo de la placa multifocal (Qahtany et al., 2018). La respuesta inflamatoria en el desarrollo de la aterosclerosis involucra elementos tanto de la inmunidad innata como de la adaptativa (Libby et al., 2009).

Los estadios primarios de la enfermedad comprenden el aumento del contenido lipídico en sangre, y por ende un reclutamiento de plaquetas, linfocitos T y monocitos a los vasos sanguíneos mediante la secreción de quimiocinas (Nakano et al., 2013). Éstas se asocian con las células endoteliales mediante moléculas de adhesión como por ejemplo VCAM-1 (*vascular adhesion molecule*), ICAM-1 (*intercellular adhesion molecule 1*) y P-selectinas, lo que provoca la migración mediante diapédesis de estas células al espacio subendotelial (Brien et al., 1993; Mahmoudi, 2018). Las primeras células en llegar son las plaquetas, sus receptores de membrana (Ib e IIb/IIIa) interactúan con ligandos presentes en las células endoteliales activándolas. La entrada de los monocitos al espacio subendotelial es el paso más importante para el desarrollo de la aterosclerosis. Las partículas de LDL (*low density lipoprotein*) circulando en el torrente sanguíneo entran también al espacio subendotelial acumulándose allí y oxidándose, lo que promueve el desarrollo de la placa de ateroma (Ginter & Simko, 2013). Una vez que los monocitos se ubican en la íntima (capa más interna de los vasos sanguíneos) se diferencian a macrófagos espumosos internalizando las partículas de LDL oxidadas, secretando a su vez moléculas pro-inflamatorias como lo son la interleuquina-1 (IL-1) y el TNF- $\alpha$  (tumor necrosis factor- $\alpha$ ).

Los mastocitos también tienen un rol activo en el desarrollo de la placa de ateroma. Se ha encontrado evidencias sólidas de la participación de este tipo celular en el desarrollo de aterosclerosis en ratones (Bot et al., 2007; Sun et al., 2007). Los mastocitos favorecen la angiogénesis al secretar histamina y leucotrienos, enzimas capaces de romper el enlace peptídico con serina en el sitio activo, heparina y cofactores del factor de crecimiento (Libby et al., 2009).

En las placas de ateroma y nodos linfáticos regionales también se encuentran células dendríticas, las cuales fagocitan antígenos para presentárselos luego a las células T inmaduras. Son antígenos característicos en este contexto de inflamación las proteínas del shock térmico, fragmentos de lipoproteínas plasmáticas y hasta algunas estructuras microbianas (Libby et al., 2009). Los linfocitos T CD4+, una vez que logran llegar al espacio subendotelial, interactúan con los macrófagos presentes mediante la interacción de receptor de membrana/ligando (CD40/CD40L) amplificando de esta forma la secreción de moléculas pro-inflamatorias (Mahmoudi, 2018), lo que genera una respuesta de tipo Th1 que favorece la formación de la placa. A su vez, los linfocitos T CD8+ que logran ingresar al sitio de desarrollo de la placa tienen la capacidad de destruir células del músculo liso y macrófagos. Un tercer tipo de células T que logran

ingresar son las reguladoras, las cuales desencadenan una respuesta de tipo Th17 que contribuye a la respuesta inflamatoria y también a la trombosis (Libby et al., 2009). Este ambiente pro-inflamatorio desencadena una serie de reacciones que modifican la estructura de las paredes vasculares y llevan a la formación de una veta de grasa, la cual evoluciona en un engrosamiento mayor de la pared que luego termina en fibroateroma y por último la formación de la placa de ateroma (Qahtany et al., 2018). En la figura 1.5.1 puede observarse imágenes comparativas de vasos sanguíneos sanos y afectados por aterosclerosis.



**Figura 1.5.1:** Fotografías de autopsia de una aorta abdominal normal (a) así como arterias coronarias normales (b), comparado con autopsia de una aorta abdominal con aterosclerosis severa (c) y arterias coronarias totalmente obstruidas con aterosclerosis (d). Figura extraída de Schaefer, 2010.

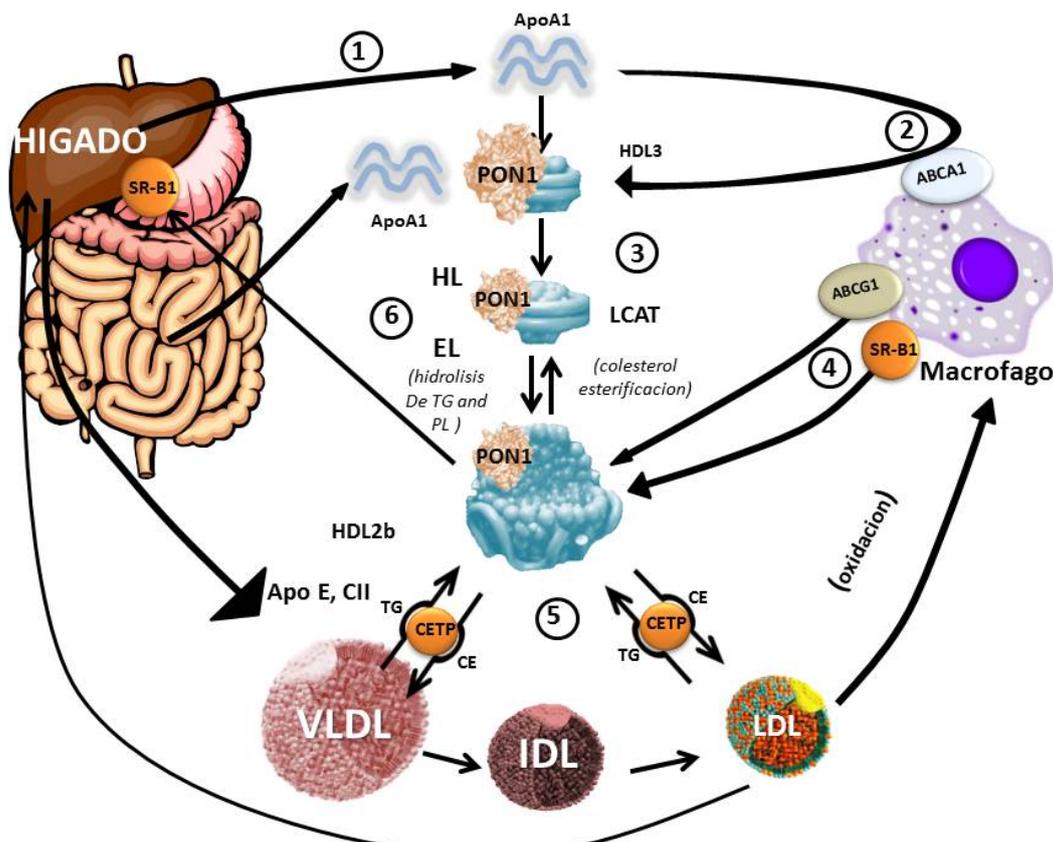
Otro aspecto del vínculo de la respuesta inmune adaptativa con el desarrollo de la placa de ateroma es que la respuesta inmune humoral generada por las células B atenúa la propagación de la aterosclerosis. En pacientes a los que se les ha extirpado el bazo (llevando a un déficit de células B), esa enfermedad empeora (Caligiuri et al., 2002). A su vez, se ha constatado que ratones con exceso de lípidos en sangre presentan una respuesta humoral específica contra antígenos provenientes del LDL oxidado (Hartvigsen et al., 2009). Conejos inoculados con ese tipo de antígenos presentan una atenuación en el desarrollo de la aterosclerosis, lo cual resulta interesante para utilizar como terapia contra esta enfermedad (Libby et al., 2009).

Moléculas con propiedades capaces de aplacar el desarrollo de esta condición son las lipoproteínas de alta densidad (*high density lipoprotein*, HDL), las cuales cuentan con cierta actividad antioxidante (Gugliucci, 2017). Evitar la oxidación de este tipo de moléculas puede ser de gran interés a la hora de prevenir el desarrollo de la aterosclerosis.

## 1.6 Lipoproteína de alta densidad (HDL)

Lipoproteínas de alta densidad (*high density lipoprotein*, HDL), es el término que se refiere a un grupo altamente heterogéneo de partículas esféricas o discoidales con una densidad de 1,063 g/mL, conteniendo en su superficie múltiples proteínas asociadas (en su mayoría apolipoproteína A-I o apoA-I) (Baldán & De Aguiar Vallim, 2016; Gugliucci & Menini, 2015).

El primer paso para la biogénesis de las partículas de HDL es la síntesis de apoA-I por el hígado e intestino, luego la proteína transportadora de esteroides *ATP-binding cassette transporter A1* (ABCA1) promueve el transporte de colesterol y fosfolípidos a la apoA-I pobre en lípidos, conformando la pre $\beta$ -HDL. A continuación, el colesterol libre circulante es esterificado por la enzima lecitina:colesterol aciltransferasa (LCAT) y lo transloca al interior de la partícula de HDL, madurando y convirtiéndose en HDL3 y luego en HDL2 a medida que aumenta de tamaño. Esta HDL2 moviliza más colesterol proveniente de macrófagos y otras células utilizando otros transportadores de colesterol como el ATP-binding cassette transporter G1 (ABCG1) y scavenger-receptor class B, type 1 (SR-BI). En el siguiente paso, la HDL2 madura interactúa con la enzima colesterol ester:triacilglicérido *transfer protein* (CETP) la cual facilita el intercambio de esteres del colesterol y triglicéridos con las partículas de LDL y VLDL (*very low density lipoprotein*). Las mutaciones deletéreas de CETP en humanos se ha visto que generan hiperalfalipoproteinemia (altos niveles de HDL). Por último, la lipasa endotelial (EL) remodela las partículas de HDL en partículas más pequeñas, mientras que la lipasa pancreática (HL) se encarga de la hidrólisis de triglicéridos (Baldán & De Aguiar Vallim, 2016; Gugliucci, 2017). Este proceso se ve resumido en la figura 1.6.1, donde se numera cada uno de los pasos antes mencionados del 1 al 6, figura extraída de Gugliucci, 2017.

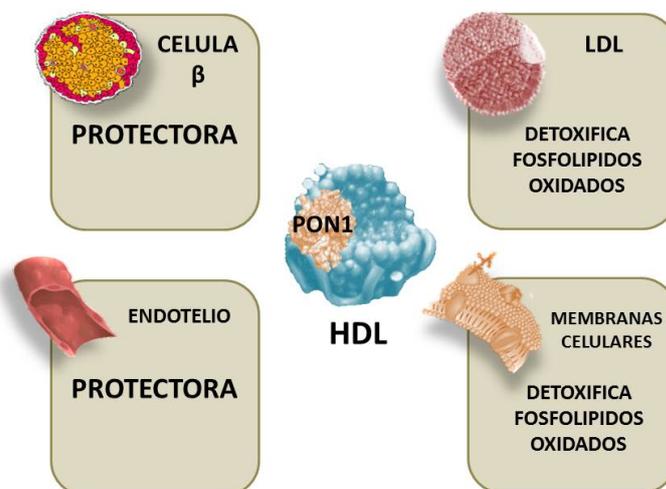


**Figura 1.6.1:** Esquema representativo de la biogénesis y metabolismo de la HDL, los pasos mencionados anteriormente se señalan numéricamente (1-6). Figura adaptada extraída y adaptada de Gugliucci, 2017.

Existen diferentes tipos de HDL, los cuales se componen de proteínas diferentes y cumplen diversas funciones biológicas. Según el tipo de proteínas asociadas a su superficie son las actividades en las que participa, jugando roles importantes en la hemostasis, trombosis, sistema inmune y del complemento, etc. (Gugliucci & Menini, 2015). Muchos estudios demostraron que hay una gran variedad de partículas de HDL compuestas por diferentes tipos de proteínas (Blanche et al., 1981; Davidson et al., 2009; Kontush & Chapman, 2006, 2010; Kontush et al., 2008; Kontush & Chapman, 2008; Navab et al., 2011; Ridker et al., 2010; Williams & Feldman, 2011). Es considerada una partícula con importantes funciones fisiológicas como el transporte inverso de colesterol, varios procesos anti-inflamatorios y la anti-oxidación controlada de lipoproteínas (Asztalos, 2010). Se han identificado y clasificado principalmente según su tamaño, utilizando geles nativos PAGE, y se clasifican en: HDL3c, HDL3b, HDL3a; HDL2b y HDL2a (Rosenson *et al.*, 2011). Mediante ultracentrifugación se han podido separar según su densidad en dos sub-fracciones: las HDL2 (densidad entre 1.063 y 1.125 g/mL) y HDL3 (densidad entre 1.125 y 1.121 g/mL) (Fisher et al., 2012). Con respecto a sus funciones, se ha visto en investigaciones previas que las fracciones más grandes de HDL son las que presentan mayor actividad anti-ateroma, debido a que en pacientes con enfermedades coronarias (ECs) estos tipos de HDL son los que se

ven mayormente disminuidos (Rosenson *et al.*, 2011; Brown *et al.*, 2010). Sin embargo, esto no es del todo claro dado que también se ha visto que la PON1 se une preferentemente a las partículas HDL3 más pequeñas, por lo cual presentan mayor actividad antioxidante (DiMarco & Fernandez, 2015). Además presentan un mejor transporte reverso del colesterol dado que son mejores receptores de colesterol por parte de los tejidos periféricos, y evitan la formación de las células espumosas por parte de los macrófagos disminuyendo el desarrollo de aterosclerosis (Fisher *et al.*, 2012; Ginter & Simko, 2013; Gugliucci, 2017).

La paraoxonasa 1 (PON1) es una lactonasa y esterasa (dependiente de  $\text{Ca}^{2+}$ ) secretada en el hígado hacia el torrente sanguíneo donde se asocia predominantemente con la HDL, un pequeño porcentaje de esta enzima se asocia también a VLDL pero se sugiere que esta interacción se da como vehículo para asociarse finalmente a la HDL (Deakin *et al.*, 2005). Una vez asociada a la HDL, necesita a la apoA-I para activarse completamente, así como interactuar con la apolipoproteína J (apoJ) también presente en la superficie de estas partículas (Gugliucci, 2017; Gugliucci & Menini, 2015). Las partículas de HDL que contienen PON1 asociada a apoA-I y apoJ, presentan actividad antioxidante, anti-inflamatoria y mejores propiedades transportadoras de lípidos, también se ha visto que presentan actividad anti-ateroma dado que evitan la formación de células espumosas por parte de los macrófagos y logra prevenir la oxidación de LDL y las membranas celulares (Gugliucci, 2017; Gugliucci & Menini, 2015). Se ha visto que la PON1 está relacionada a una disminución en el desarrollo de la aterosclerosis, dado que estudios con ratones *knock-out* para esta enzima presentaron un desarrollo acelerado de esta enfermedad (Reddy *et al.*, 2008; Seo & Goldschmidt-Clermont, 2009; Tward, 2002). En la figura 1.6.2 se resumen las principales funciones de la HDL, algunas de estas acciones son ejecutadas directamente por la PON1.



**Figura 1.6.2:** Principales actividades fisiológicas de la HDL conteniendo PON1. Figura extraída y adaptada de Gugliucci, 2017.

Múltiples investigaciones (Dantoine et al., 1998; Gugliucci et al., 2006; Karabina et al., 2005) han reportado que en pacientes con ECVs, diabetes e insuficiencia renal, tanto la cantidad de PON1 y su actividad se ven disminuidas debido a su oxidación.

Buscar alternativas para evitar la oxidación de la PON-1 y estudiar el espectro de partículas de HDL y sus efectos en la salud, resulta de gran importancia a la hora de disminuir los riesgos de sufrir ECs. El interés por compuestos naturales con propiedades antioxidantes y antiglicantes cobra cada día más interés, se ha constatado que fuentes de compuestos de este tipo son las hierbas medicinales (Rodrigues Franco et al., 2018; Wojdyło et al., 2007; Zheng & Wang, 2001).

## 1.7 Fitoquímica y hierbas medicinales

La fitoquímica o cura de enfermedades mediante el uso de plantas medicinales, ha estado presente en la historia de todas las culturas humanas. Sus fundamentos siempre fueron completamente empíricos, basados en la observación de sucesos naturales como la reacción de animales al ingerir ciertas plantas o asociaciones arbitrarias como la similitud de color o de forma con el órgano afectado o con sus dolencias. El uso de plantas medicinales se remonta a civilizaciones tan antiguas como la persa (siglo XVII A.C.), y cuyas prácticas recogieron luego los egipcios (siglo XVI A.C.). Gracias a éstos este conocimiento llegó a los griegos, quienes fueron los responsables de introducirlo en el resto de Europa. A su vez, en el Antiguo Testamento se encuentran citas de plantas medicinales usadas por los judíos mucho tiempo antes de Cristo. Incluso, se cuenta con información que afirma que las primitivas y alejadas civilizaciones de la India y de China, varios milenios antes de Cristo, también utilizaban plantas con fines curativos (Arrillaga de Maffei, 1969). Las poblaciones indígenas latinoamericanas presentan grandes conocimientos referentes a las plantas medicinales, siendo éstas su principal recurso medicinal. Su modo de preparación y aplicación es una información cultural que se transmite oralmente de generación en generación. Su versatilidad es enorme, encontrándose en productos tan diferentes como pomadas, jarabes, tés, jabones, shampoos, entre otros (Cosme Pérez, 2008).

Se consideran plantas medicinales todas aquellas que en su composición presentan un principio activo que en dosis determinadas tenga efectos curativos sobre los animales. Se estima que de las 260.000 especies de plantas conocidas hoy en día, un 10% se pueden considerar medicinales (Cosme Pérez, 2008).

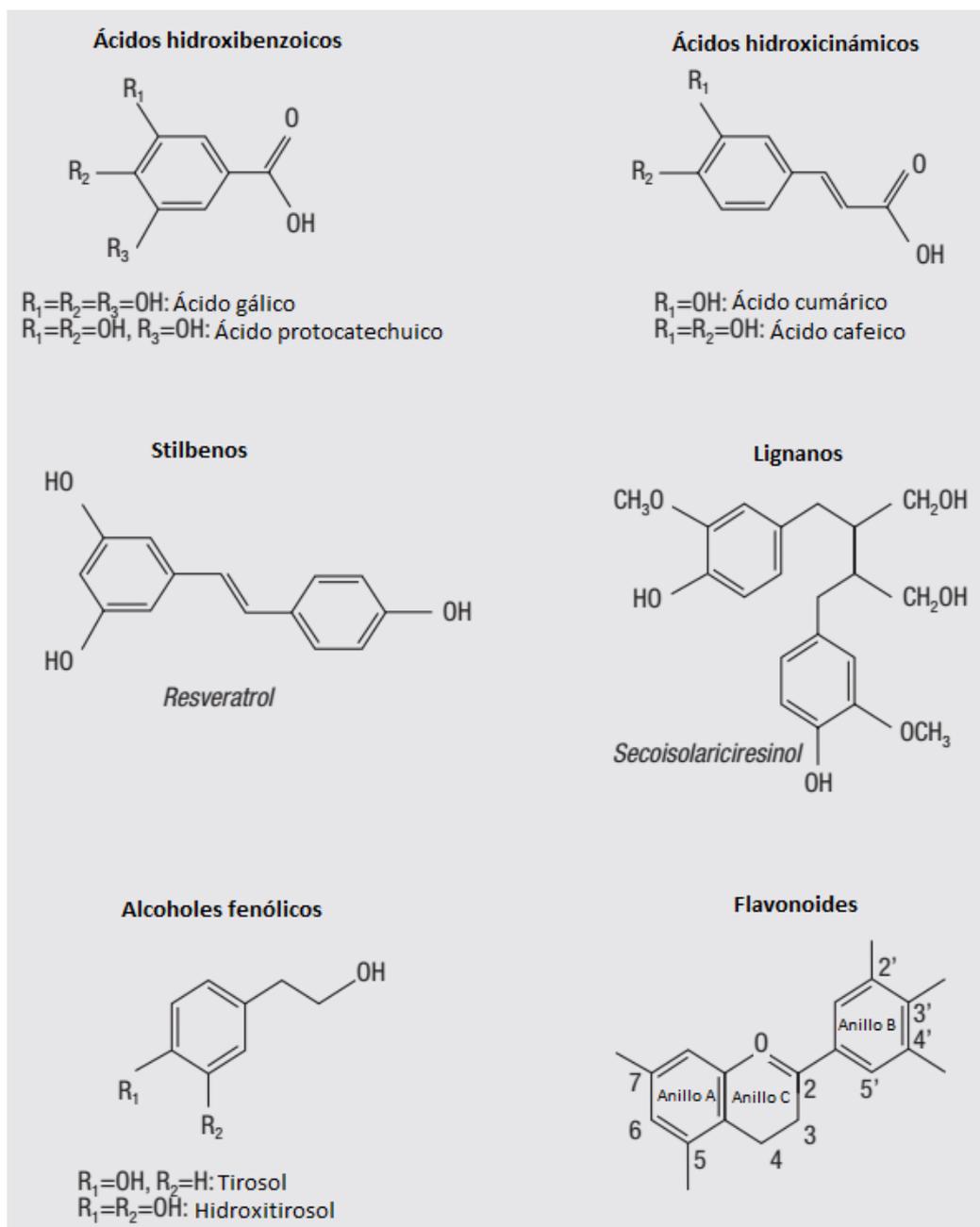
En América Latina es donde se concentra la mayor variedad de plantas del planeta. Cuenta con más de 55.000 especies conocidas, de las cuales aproximadamente 10.000 presentan principios activos con utilidad terapéutica (Barg Venturini & Queirós Armand Ugón, 2007). Durante el siglo dieciocho, muchas plantas medicinales fueron traficadas por parte de la corona Española desde varios países latinoamericanos. Solo por nombrar algunas de ellas: diferentes especies de smilax, palo santo (guaiacum), la caña fístula (*Cassia fistula*), canela en rama, etc. (Gänger, 2015).

En Uruguay existe una gran variedad de hierbas cuyas infusiones se usan para tratar o curar diferentes afecciones. Los conocimientos actuales sobre el uso popular de plantas es producto de la diversa constitución social y cultural del país, con mezclas de origen indígena, afroamericano, europeo y criollo. El consumo de plantas medicinales en el país se abastece por recolección en su hábitat natural o mediante la importación de plantas. Un porcentaje menor procede del cultivo de hierbas medicinales en forma orgánica. Hoy en día puede verse en pequeñas huertas y jardines, el cultivo de plantas medicinales a lo largo del territorio (Barg Venturini & Queirós Armand Ugón, 2007).

Entre los usos que se les ha dado a las plantas medicinales a lo largo de los años, se destacan los efectos antiinflamatorios, antivirales, antitumorales, antimalaricales y analgésicos (Raina et al., 2014). Los compuestos activos de dichas plantas (fitoquímicos) pueden ser simples como los alcaloides, o más complejos como las resinas, aceites esenciales, etc. (Cosme Pérez, 2008).

### **1.7.1 Compuestos fitoquímicos**

Los compuestos fitoquímicos son compuestos bioactivos presentes en alimentos de origen vegetal, los cuales no constituyen nutrientes esenciales para la vida pero presentan efectos positivos en el organismo. Los compuestos fenólicos son un tipo de compuestos fitoquímicos que presentan gran capacidad antioxidante, ellos son: los flavonoides, ácidos fenólicos, alcoholes fenólicos, estilbenos y lignanos, sus estructuras se muestran en la Figura 1.7.1.1 (D'Archivio et al., 2007). Algunos de estos compuestos se encuentran específicamente en determinados alimentos (flavanonas en frutas cítricas, isoflavonas en soja, etc.), mientras que otros como la quercetina se encuentran en una gran variedad de alimentos como vegetales, frutas, leguminosas, cereales, etc. (D'Archivio et al. , 2010).



**Figura 1.7.1.1:** Principales antioxidantes en plantas medicinales. Figura extraída de D’Archivio et al., 2007 y adaptada.

Los flavonoides son los compuestos fenólicos más abundantes y se encuentran principalmente en los tejidos de las plantas. Proviene de los aminoácidos aromáticos, fenilalanina y tirosina (Khoddami et al., 2013). Presentan un esqueleto común de carbono que consta de dos anillos benceno (A y B) unidos mediante tres carbonos que junto con el anillo A forman un pirano llamado anillo C (D’Archivio et al., 2007). Estos compuestos tienen la capacidad de barrer radicales libres incluyendo los hidroxilo, peróxido y superóxido y también pueden quelar metales inactivándolos (Embuscado, 2015). Los flavonoides más abundantes presentes en plantas son: la quercetina, el kaempferol, la luteolina y la apigenina (Ozkan et al., 2016). La familia de flavonoides se

divide en varias subclases, estas incluyen a los flavonoles, iso-flavonoles, flavonas, flavanoles, flavanonas, antocianinas, antocianidinas, proantocianidinas y catequinas (Akhlaghi & Foshati, 2017; D'Archivio et al., 2007; Khoddami et al., 2013).

- Flavonoles: presentan un doble enlace entre el carbono 2 y el 3 del anillo C y un grupo hidroxilo en la posición del carbono 3 (figura 1.7.1.1). El compuesto representante de esta subclase de flavonoides es la quercetina (D'Archivio et al., 2007).
- Iso-flavonoles: presentan similitudes con la estructura del estrógeno y por eso son capaces de unirse a receptores específicos para esta molécula. Su estructura incluye grupos hidroxilo en los carbonos 4 y 7 (figura 1.7.1.1). Están presentes casi exclusivamente en las leguminosas y son sensibles al calor (D'Archivio et al., 2007).
- Flavonas: presentan un doble enlace entre los carbonos 2 y 3 del anillo C (figura 1.7.1.1). Se encuentran únicamente en el perejil y el apio por lo que son los flavonoides menos comunes (D'Archivio et al., 2007).
- Flavanoles: presentan una cadena de tres carbonos saturada y un grupo hidroxilo en el carbono 3 del anillo C (figura 1.7.1.1), existen en su forma de monómero o de polímero (catequinas y proantocianidinas, respectivamente). Los más representativos en hierbas medicinales son la galocatequina, epigalocatequina y epigalocatequina galato (D'Archivio et al., 2007).
- Antocianinas: son hidrosolubles y son responsables de los colores entre el rojo y el azul de algunas frutas y plantas. Presentan una glucosa en la posición del carbono 3 del anillo C, o en las posiciones 5 y/o 7 del anillo A (figura 1.7.1.1). En algunos casos aislados se han visto glicosilaciones en las posiciones de los carbonos 3'-, 4'-, 5' del anillo B (D'Archivio et al., 2007).
- Antocianidinas: son la forma aglicona de las antocianinas. Están agrupadas en: 3-hidroxi-antocianidinas, 3-deoxi-antocianidinas y O-metiladas. Las más comunes son la: cianidina, delphinidina, pelargonidina, peonidina, petunidina y malvidina (Khoo et al., 2017).

Los ácidos fenólicos se encuentran en forma de ésteres, glicósidos y aminas. Varían según el número y la locación de los grupos hidroxilos en el anillo aromático (Khoddami et al., 2013). Se dividen en dos grupos: los que derivan del ácido benzoico y los que derivan del cinámico (figura 1.7.1.1) (D'Archivio et al., 2007).

- Ácidos hidroxibenzoicos: incluyen a los ácidos gálico, vanílico, siríngico y protocatechuico. No son muy abundantes en los alimentos, con la excepción del ácido gálico, el cual se encuentra en plantas medicinales (D'Archivio et al., 2007; Khoddami et al., 2013).

- Ácidos hidroxicinámicos: incluyen a los ácidos ferúlico, cafeico, p-cumárico y sinápico, siendo el cafeico el más abundante de ellos. A su vez, este último puede combinarse con el ácido quínico para generar ácido clorogénico, abundante en frutas, en el café y en el mate (D'Archivio et al., 2007; Khoddami et al., 2013).

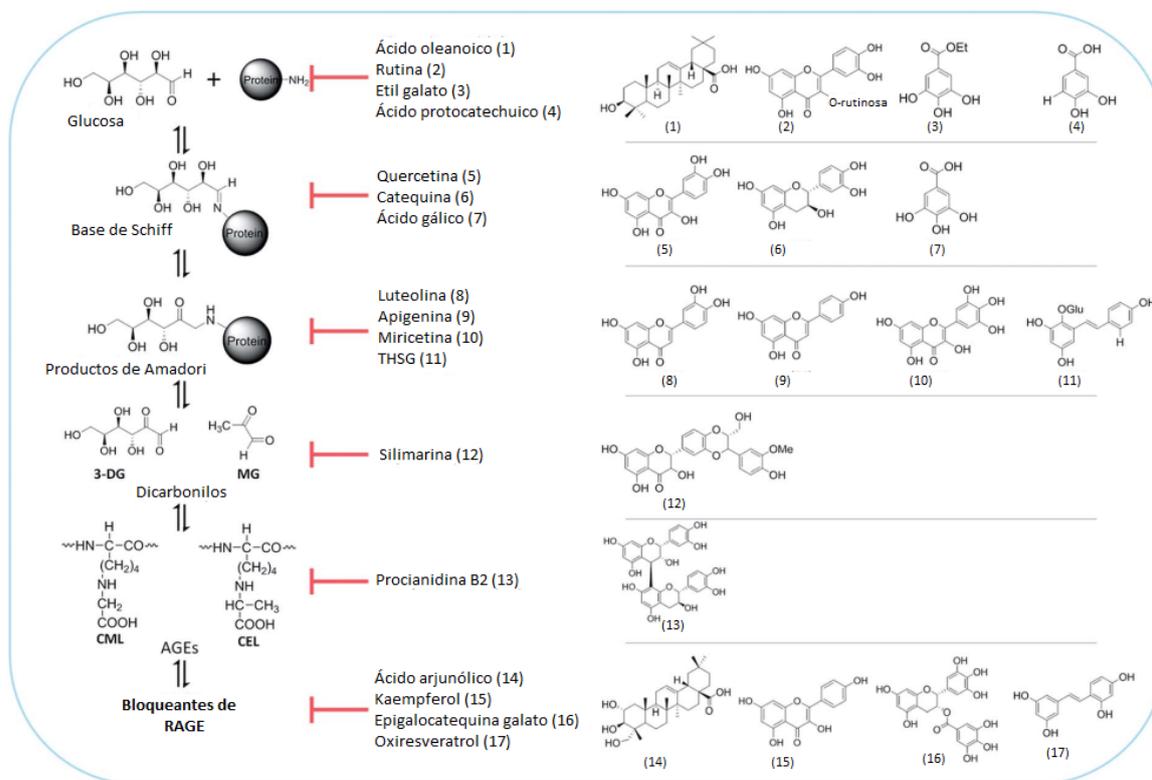
El tirosol (4-hidroxifeniletanol) y el hidroxitirosol (3,4-dihidroxifeniletanol) son los principales alcoholes fenólicos. Se encuentran principalmente en el aceite de oliva extra virgen, también en el vino y la cerveza (D'Archivio et al., 2007).

Los estilbenos son metabolitos secundarios de las plantas, sintetizados como respuesta ante patógenos. El principal representante de éstos es el resveratrol (figura 1.7.1.1), que existe tanto en forma cis o trans como glicosilado (D'Archivio et al., 2007).

Los lignanos son el resultado de la dimerización oxidativa de dos unidades de fenilpropano (figura 1.7.1.1). La microflora intestinal metaboliza a los lignanos originando enterodiol y enterolactona (D'Archivio et al., 2007). Su estudio resulta de gran interés dado que se ha visto que presentan actividad antioxidante, anti-inflamatoria, antimicrobiana, etc. (Marcotullio et al., 2018). A su vez, también se ha visto que presentan actividad anti-cancerígena (Rauf et al., 2018).

### 1.7.2 Compuestos fenólicos y regulación de la formación de AGEs

Muchos de los compuestos fenólicos introducidos en el apartado 1.7.1 presentan no solo actividad antioxidante, sino también actividad antiglicante (Ramkissoon et al., 2013; Rasheed et al., 2018; Su-Chen et al., 2014). Matsuda et al., 2003 determinaron que las flavonas presentan mayor actividad antiglicante que los flavonoles, flavanoles e iso-flavonoles. A su vez, constataron que grupos hidroxilo en los carbonos 3, 4, 5 y 7 (figura 1.7.1.1) favorecen esta actividad, mientras que la metilación y glucosilación del hidroxilo en la posición 4 puede disminuirla. La actividad que presentan las flavonas es mayor que las correspondientes a los flavonoles, flavanonas e iso-flavonas (figura 1.7.1.1). En la figura 1.7.1.2 se presentan diferentes compuestos fenólicos con actividad inhibitoria de la formación de AGEs y a qué nivel del proceso de formación actúan.



**Figura 1.7.1.2:** Proceso de formación de los AGEs y algunos compuestos fitoquímicos conocidos por inhibir la reacción de glicación en diferentes etapas, figura extraída y adaptada de Chinchansure et al., 2015.

### 1.7.3 Hierbas medicinales de uso común en Uruguay y la región

Como se mencionó anteriormente, las hierbas medicinales se utilizan mucho en Uruguay y la región con diversos propósitos, siendo la más popular y consumida la yerba mate (*Ilex paraguariensis*). Se utiliza para preparar “mate”, una bebida muy consumida en Brasil, Paraguay, Argentina y Uruguay, donde se estima que el consumo per cápita llega al litro por día. Muchas poblaciones indígenas utilizaban esta hierba con fines curativos frente a numerosas patologías (Mateos et al., 2018). Resulta muy interesante, dado que muchos estudios destacan su gran cantidad de compuestos fenólicos y su importante actividad antioxidante (Bremer Boaventura et al., 2015; Colpo et al., 2016; Ghassan Riachi & Bastos De Maria, 2017; Mateos et al., 2018; Reis et al., 2015). Extractos acuosos de esta hierba cuentan además una gran actividad antiglicante, evitando la reacción de glicación entre el metilglioxal y la proteína de suero bovina (BSA, su sigla en inglés) (Gugliucci et al., 2009; Lunceford & Gugliucci, 2005). Asimismo, se ha constatado que la inhibición de la reacción de glicación entre proteínas y fructosa o glucosa también se da dentro del tracto gastrointestinal, reduciendo notablemente la formación endógena de compuestos AGEs (Bains & Gugliucci, 2017). Además, el estudio realizado por Menini et al., 2007 demuestra que extractos acuosos de esta hierba resultan ser efectivos en reducir la oxidación de la

PON-1. Con todos estos datos sobre *Ilex paraguariensis*, se decidió seleccionar otras hierbas de alto consumo en la zona para poder analizar más en profundidad, y en un futuro utilizar como fuente de ingredientes funcionales en alimentos capaces de prevenir el desarrollo de ECNTs.

*Peumus boldus* Mol., mejor conocida como boldo, es una planta común de América Latina y está presente en el territorio uruguayo. Las infusiones acuosas de boldo se utilizan como estimulante digestivo, diurético, calmante, y en tratamientos para desórdenes hepáticos y de vesícula biliar (Soto et al., 2014). Estudios indican que las hojas de esta hierba poseen más de 30 compuestos como glicósidos de quercetina, derivados de kaempferol, ácidos fenólicos y pro-antocianidinas, lo que se traduce en una gran actividad antioxidante incluso protegiendo contra la toxicidad mitocondrial inducida por hierro, efectos quimiopreventivos y antibacteriales (O'Brien et al., 2006; Rodríguez Vaquero et al., 2010; Simirgiotis & Schmeda-Hirschmann, 2010; Vargas Klimaczewski et al., 2014).

*Mentha x piperita* L., o menta, es otra hierba de alto consumo en la región. Es un híbrido ente *Mentha aquatic* y *M. spicata* L y es originaria de la zona Mediterránea, sin embargo hoy en día se encuentra en todo el mundo (Damjanovic-Vratnica et al., 2016). Tradicionalmente esta hierba y su aceite se han utilizado como antiespasmódico, antiséptico, así como en tratamientos contra el cáncer, dolores estomacales, de garganta, etc. (DAMJANOVIC-VRATNICA et al., 2016). Muchos estudios sugieren que presenta actividad antibacteriana, así como una gran actividad antioxidante capaz no solo de inhibir la formación de  $\cdot\text{NO}$ , sino también de contrarrestar sus efectos negativos (Figuroa Pérez et al., 2014; Najafian et al., 2016; Neeraj et al., 2008; Uribe et al., 2016).

A diferencia de la *Mentha x piperita* L., *Baccharis trimera* Less. o carqueja es una planta nativa del sur de Brasil, Paraguay, Uruguay y Argentina (De Oliveira et al., 2012). Infusiones acuosas con las partes aéreas de esta planta se usan tradicionalmente no solo para tratar problemas gastrointestinales y hepáticos, sino también frente a procesos inflamatorios (Abad & Bermejo, 2006). Numerosos trabajos han demostrado su actividad antiinflamatoria tanto del extracto acuoso como del etanólico, su protección contra las lesiones ulcerosas gástricas, así como su poder analgésico, antioxidante y antihepatotóxico (De Oliveira et al., 2012; dos Reis Lívero et al., 2016; Da Cruz Pádua et al., 2014; Rabelo et al., 2017; Sabir et al., 2017).

Para la realización de este estudio, se utilizaron dos solventes, agua destilada a temperatura de ebullición y etanol 95% a temperatura ambiente. El primer solvente se seleccionó dado que además de lograr extraer compuestos altamente polares, de esa forma se podría estudiar lo que se ingiere al preparar una taza de té, y qué efectos presenta en el organismo este consumo. El etanol 95% se seleccionó dado que permite la extracción de compuestos polares y semipolares como flavonoides, alcaloides, flavonas, polifenoles y taninos, y a su vez se vio que extractos de estas características

exhiben actividades antioxidantes y antiglicantes interesantes en varias hierbas (Franco et al., 2018).

Los compuestos fenólicos con propiedades bioactivas, pueden ser utilizados en la formulación de alimentos funcionales de forma de prevenir el desarrollo de múltiples enfermedades. Por lo tanto, debe estudiarse su comportamiento a lo largo del tracto gastrointestinal una vez que fueron consumidos de forma de determinar si continúan presentando bioactividad al alcanzar e intestino y ser finalmente absorbidos. En el siguiente apartado se introducirá el aparato digestivo con los órganos que lo componen, así como los conceptos de bioaccesibilidad y biodisponibilidad.

## 1.8 Bioaccesibilidad y biodisponibilidad

### 1.8.1 Breve descripción del aparato digestivo

El aparato digestivo es un conjunto de órganos destinados al procesamiento y asimilación de los alimentos, convirtiéndolos en sustancias más simples capaces de ser utilizadas como energía por el organismo. Conforman un tubo que abarca desde la boca al ano por donde el alimento circula y sufre modificaciones, de forma de que el organismo pueda obtener los nutrientes necesarios. A lo largo de este pasaje se da el proceso de digestión, que se define como el desglose de los principales componentes de los alimentos (glúcidos, proteínas y lípidos) en unidades más sencillas, su absorción a través de las paredes intestinales y su transporte por la sangre (Campbell & Reece, 2007; Cannon, 2013).

El tracto se compone de cuatro capas de tejido: la más externa se llama serosa y forma parte de un gran tejido llamado peritoneo, el cual recubre los órganos internos y los ancla a las paredes abdominales mediante extensiones llamadas mesenterios. La capa muscular se compone de músculos circulares y longitudinales, y sus contracciones ayudan al pasaje del alimento a lo largo del tracto. La tercera capa se llama submucosa y es donde se encuentran los vasos sanguíneos y linfáticos y los nervios. La cuarta capa y más interna, se llama mucosa y cuenta con glándulas dado que es la que se encarga de secretar sustancias y absorber los nutrientes (Scheirer Ed.D., 2013).

El tubo se divide en varias secciones especializadas para cumplir diferentes funciones en el procesamiento del alimento. El proceso de digestión comienza en la boca al ingerir el alimento y finaliza en el intestino delgado, produciéndose modificaciones físicas y químicas de dicho alimento durante su pasaje.

Los órganos que forman parte del aparato digestivo son:

- **Boca y glándulas salivales:** en esta cavidad se lleva a cabo la primera etapa de la digestión. Las glándulas salivales generan saliva la cual sirve para lubricar la cavidad y al interactuar con el alimento lo transforman en bolo alimenticio. La saliva tiene un pH entre 6,5 y 7 y contiene numerosas enzimas capaces de

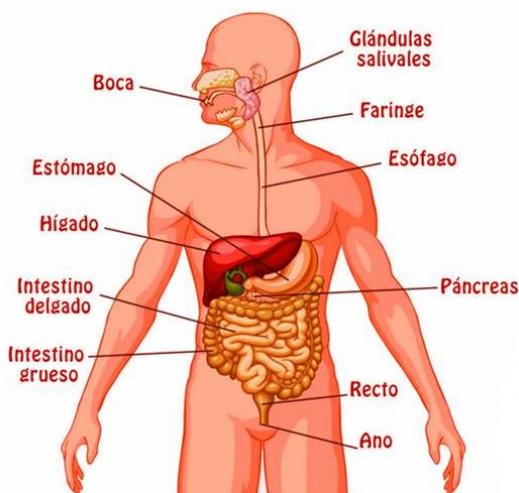
alterar químicamente los componentes del alimento. Una de las enzimas más importantes es la amilasa, la cual se encarga de degradar polisacáridos (especialmente el almidón) a compuestos más pequeños.

- Faringe: es un órgano con forma de tubo que conecta la cavidad bucal y las fosas nasales con el esófago y la laringe, respectivamente. Es parte tanto del aparato digestivo como del respiratorio, siendo estas diferentes vías separadas por una estructura cartilaginosa llamada epiglotis.
- Esófago: es un órgano también de forma tubular por donde circula el bolo alimenticio luego de atravesar la faringe hasta llegar al estómago. Presenta movimientos musculares capaces de hacer avanzar al bolo a lo largo del recorrido y además ayuda a su procesamiento (Cannon, 2013).
- Estómago: es el órgano que recibe al alimento una vez que éste atraviesa el esófago y se encarga de mezclar, almacenar y procesar los alimentos transformándolos en quimo (papilla pastosa). Tiene forma de J y se divide en 5 áreas: Cardias (orificio que conecta con el esófago), Fundus, Cuerpo, Antro y Píloro (esfínter que comunica con el duodeno). Contiene jugo gástrico, el cual entre otros componentes presenta ácido clorhídrico que disminuye el pH a un valor aproximado de 2, y junto con los movimientos peristálticos se encargan de procesar el alimento. Dicho jugo contiene además enzimas proteasas (como la pepsina) las cuales se encargan de degradar las proteínas presentes en el bolo. A su vez, la digestión de los lípidos continúa en este órgano gracias a la lipasa gástrica. El vaciado se da de forma paulatina y demora aproximadamente 2 horas (Cannon PhD, 2013).
- Páncreas: es una glándula asociada al duodeno. Se encarga de producir jugo pancreático que se libera en el intestino y ayuda a digerir el quimo. A su vez, este órgano regula la concentración de glucosa en sangre mediante la secreción de enzimas como la insulina y el glucagón.
- Hígado: es un órgano que presenta cuatro lóbulos: el derecho, el izquierdo, el cuadrado y el caudado. Produce y excreta (junto a la glándula biliar) una secreción llamada bilis, la cual tiene el rol de emulsionar los alimentos y de esta forma permite que se absorban mejor los ácidos grasos. Está compuesta de agua, colesterol, lecitina, pigmentos biliares (bilirrubina y biliverdina), sales biliares (glicolato de sodio y taurocolato de sodio) e iones bicarbonato.
- Vesícula biliar: es un órgano hueco y pequeño situado debajo del hígado, comunicado con éste y el duodeno (mediante un conducto llamado colédoco). Su rol es el de acumular y almacenar la bilis producida por el hígado y secretarla hacia el duodeno durante el proceso de digestión.
- Intestino delgado: es un órgano tubular que puede llegar a medir entre 6 y 7 metros y de 2,5 a 3 centímetros de diámetro. A lo largo de este órgano se continúa con el proceso de digestión, pero a su vez también se comienza con la absorción de nutrientes. Sus paredes presentan vellosidades especializadas

para aumentar el área de contacto con el alimento para que el proceso de absorción sea más efectivo. Consta de tres secciones: el duodeno que es la primera porción del intestino delgado, mide entre 25 y 30 centímetros y es donde se secretan la bilis y el jugo pancreático para su interacción con el quimo. El yeyuno es la porción que continúa al duodeno y su función es la de absorber los nutrientes del bolo alimenticio. El íleon es la última porción del intestino delgado, aquí también se da la absorción de nutrientes.

- Intestino grueso: es un órgano también tubular que continúa al intestino delgado, abarca desde la válvula ileocecal hasta el recto. Consta de diferentes secciones: ciego, ascendente, transverso, descendente, colon sigmoideo y recto. Tiene una longitud entre 120 y 160 centímetros y un diámetro no mayor a 3 centímetros menos en el ciego donde llega a medir 6 o 7 centímetros. Su función es la de absorber minerales, agua y vitaminas K y B12 liberadas por las bacterias presentes en el colon.
- Ano: es la abertura final de tracto gastrointestinal.

En la figura 1.8.1 puede verse el aparato digestivo completo con todos los órganos que lo componen.



**Figura 1.8.1:** Esquema representativo del aparato digestivo y los órganos que lo componen (Derrickson & Tortora, 2006).

Existen diferentes formas de simular las condiciones del tracto gastrointestinal de forma de estudiar la estabilidad de ciertos compuestos al ser ingeridos, y si los mismos logran presentar actividad una vez alcanzado el intestino. Hollebeeck et al., 2013 recopilaron varias condiciones de pH, tiempos de digestión y concentraciones enzimáticas utilizadas por diferentes estudios de simulación gastrointestinal y determinaron que las mejores obtenidas fueron tres etapas: una salivar (pH= 6,9), gástrica (pH= 2) y duodenal (pH= 7), utilizando  $\alpha$ -amilasa en la primera, pepsina

extraída de mucosa gástrica porcina en la segunda y pancreatina de páncreas porcino y bilis bovina en la tercera. Se aplicó también agitación a 350 rpm y se mantuvo durante todo el tiempo a 37°C. Actualmente se han realizado numerosos estudios utilizando este tipo de simulaciones para analizar gran variedad de matrices alimentarias (Ariza et al., 2018; Celep et al., 2018; Celep et al., 2015).

### 1.8.2 Procesos de simulación gastrointestinal

Cuando se consume un alimento se debe tener en cuenta que éste sufrirá modificaciones a medida que atraviesa el tracto gastrointestinal, por lo que no la totalidad de los compuestos presentes en la matriz alimentaria lograrán llegar hasta el intestino para ser absorbidos, o incluso pueden no presentar actividad bioactiva una vez absorbidos por las células epiteliales intestinales.

#### 1.8.2.1 Definiciones

Para poder entender mejor la interacción entre los alimentos y las paredes intestinales se definirán dos conceptos clave:

- **Bioaccesibilidad:** es la fracción de un constituyente alimentario que se libera de la matriz alimentaria en el tracto gastrointestinal quedando disponible para su absorción (Ariza et al., 2018).
- **Biodisponibilidad:** fracción de un determinado compuesto o su metabolito que alcanza la circulación sistémica sin considerar la bioactividad. La biodisponibilidad de los compuestos de la dieta depende de su estabilidad ante la digestión, la forma en que se liberan de la matriz alimentaria (bioaccesibilidad) y su habilidad para ser absorbidos por las células del intestino (Ariza et al., 2018).

En el caso de consumir compuestos con actividad bioactiva, lo primordial o más esperado es que éstos no solo logren llegar a estar bioaccesibles, sino que además sean biodisponibles, se logre verificar su presencia en la sangre del individuo y los efectos que causan en el organismo. No siempre ocurre que la bioaccesibilidad de los compuestos es la suficiente por pérdida de los mismos a lo largo de tracto gastrointestinal, y además pueden llegar a perder actividad y no causar los efectos deseados una vez absorbidos.

El metabolismo de compuestos como los fitoquímicos varía según su estructura y naturaleza. Los flavonoides, por ejemplo, generalmente se presentan glicosilados o también en forma de agliconas, lo que los hace más voluminosos al atravesar las membranas por lo que su actividad bioactiva puede no ser tan eficaz en el organismo. Asimismo, la glicosilación aumenta su solubilidad en agua, lo que favorece su absorción por las paredes intestinales (Hodnett et al., 2013). Estos compuestos pueden ser hidrolizados por enzimas o microorganismos de la flora normal y pueden ingresar a

los enterocitos mediante transporte de glucosa sodio-dependiente. Luego de perder la glicosilación, muchos de los flavonoides agliconas sufren conjugaciones en el hígado y enterocitos como proceso detoxificante del organismo. Al conjugarse, estos compuestos pierden significativamente su actividad antioxidante y dado que todo compuesto con actividad antioxidante puede también generar oxidación, este proceso sirve como detoxificación. A su vez, la conjugación favorece su excreción en la orina lo que los hace poco abundantes en plasma ( $1\mu\text{M}$ ) (Akhlaghi & Foshati, 2017). Se ha constatado que los flavonoides que mejor absorción intestinal presentan son el ácido gálico y las isoflavonas, seguidas por las catequinas, flavanonas y los glucósidos de quercetina (Manach et al., 2005). La absorción de las pro-antocianidinas y las antocianinas es muy baja, se ha estudiado que la absorción de estas últimas al consumir jugo de grosella negra es cerca del 1% (Matsumoto et al., 2001). Los metabolitos de quercetina son expulsados muy lentamente, teniendo una vida media en plasma de 11 a 28 horas (Manach et al., 2005).

A nivel sistémico, los conjugados de flavonoides pueden unirse a receptores celulares acumulándose ante prolongadas ingestiones, lo que puede favorecer sus efectos bioactivos al llegar a concentraciones de orden micromolar. A su vez, gracias a su naturaleza hidrofóbica, pueden insertarse en las membranas celulares y retrasar su excreción (Akhlaghi & Foshati, 2017).

El estudio de estos dos parámetros a la hora de evaluar la eficacia de ciertos compuestos bioactivos en el organismo es fundamental.

## 2 Objetivo

Obtener extractos capaces de inhibir la formación de los compuestos AGEs, a partir de hierbas medicinales de uso frecuente en nuestro país (*Mentha x piperita* L., *Baccharis trimera* Less. y *Peumus boldus* Mol.), proporcionando la base científica para su aplicación en alimentación y salud.

### 2.1 Objetivos específicos

1. Identificar, cuantificar y caracterizar los principales compuestos bioactivos presentes en extractos obtenidos mediante diferentes métodos de extracción (convencionales y asistidos por ultrasonido), comparar las características bioactivas de cada uno y seleccionar los más efectivos.
2. Evaluar las actividades antioxidante, antiglicante y anti-inflamatoria de los extractos seleccionados antes y después de haber sido sometidos al proceso de simulación gastrointestinal.
3. Evaluar el poder antiglicante del extracto seleccionado frente a AGEs originados por la fructosa a nivel del tracto gastrointestinal.
4. Evaluar la hipótesis de que los extractos obtenidos de las hierbas logran evitar la oxidación de la proteína PON-1 del complejo HDL, así como también evitar posibles cambios conformacionales en dicho complejo.

### 3 Materiales y métodos

#### 3.1 Equipos

Para la realización de este trabajo de maestría se utilizó el siguiente equipamiento: en todos los casos las medidas de masa se realizaron en balanza analítica Shimadzu®, modelo Uni Bloc ATX224. Para la preparación de la muestra, se utilizó un molinillo marca Fagor®, modelo ML-2006 X. Las muestras en etanol 95% fueron rotavaporadas en un rotavapor marca IKA® y modelo RV 10, con baño de agua modelo HB 10. En la determinación del contenido proteico total, se utilizaron tubos de vidrio para Kjeldahl marca Tecator®, así como el digestor (Tecator® 1007 Digestion System 6) y el destilador (Tecator® 1002 Kjelteltec System). Para la determinación de lípidos totales, se utilizó una estufa 105°C marca Edelmetall® y modelo Rostfrei, el rack de planchas calefactoras donde los extractores se ensamblan junto con el condensador es de marca Quimis®, modelo Q.308.26. La mufla utilizada tanto para la determinación de minerales por vía seca como para la determinación de fibra dietética total es de marca Thermolyne® y modelo FA 1780. El filtro utilizado para la determinación de fibra es de marca Tecator® y modelo Fibertec, mientras que el baño de agua es marca Stuart® y modelo 230VAC. Para la realización de los extractos por ultrasonido, se utilizó un equipo SONICS®, modelo Vibra-Cell Processors VCX 500/VCX 750, todos los extractos fueron liofilizados en un equipo marca BIOBASE® y modelo BK-FD10S. Para las determinaciones espectrofotométricas, se utilizó un lector de placas marca Thermo Scientific®, modelo Multiskan FC. En la identificación y cuantificación de compuestos fenólicos se utilizó un equipo de HPLC-DAD marca Agilent Technologies® y modelo 1260 Infinity, con una bomba modelo G1311C, un inyector automático modelo G1329B, un horno modelo G1316A, y un detector de arreglo de diodos modelo G1315D. Las determinaciones espectrofluorimétricas se realizaron en un lector de placas de fluorescencia marca Thermo Scientific®, modelo Varioskan®. En las simulaciones digestivas se utilizó una centrífuga marca Thermo Scientific®, modelo Sorvall ST 8R. Las lecturas espectrofotométricas en el tiempo, para medir la actividad arilesterasa de la PON-1 y seguir la oxidación del complejo HDL se realizaron en un lector de placas marca BioTek®, modelo Synergy H1. El análisis estructural del complejo HDL en condiciones nativas se llevó a cabo utilizando el kit Lipoprint HDL Subfractions\* Test, de la marca Quantimetrix®. Por último, el análisis de la actividad anti-inflamatoria de los extractos utilizando células se realizó con campana de flujo vertical clase II tipo A/B3, marca NUAIRE y modelo UN-425-400E. Las medidas de fluorescencia se tomaron utilizando un citómetro de flujo modelo FACScan, marca Becton Dickinson®.

## 3.2 Reactivos

El reactivo Folin-Ciocalteu, el ácido 2,2'-azino-bis(3-etilbenzotiazolin-6-sulfónico) (ABTS), el ácido 6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilchroman-2-carboxílico (Trolox), 2,2'-azobis(2-amidinopropano) dihidrocloruro (AAPH), 3-morfolino-sidnonimina (SIN-1), la fluoresceína, la proteína de suero bovino (BSA), el metilglioxal (MGO), la aminoguanidina (AG), el fenilacetato, así como los patrones utilizados en la determinación mediante HPLC-DAD (ácido gálico, quercetina, rutina, boldina, ácido clorogénico y ácido cafeico), la célite y las enzimas utilizadas para la determinación de fibra dietética total ( $\alpha$ -amilasa, proteasa y aminoglucosidasa), de igual manera que la pancreatina, pepsina y bilis utilizadas para la simulación digestiva son marca SIGMA-Aldrich® (St. Louis, MO, USA). El persulfato de potasio ( $K_2S_2O_8$ ) utilizado para activar el ABTS, sulfato de cobre ( $CuSO_4$ ) y sulfato de potasio ( $K_2SO_4$ ) utilizados como catalizadores para el método de Kjeldahl se obtuvieron de J. T. Baker. El resto de los químicos que se utilizaron son de calidad para análisis. Para el análisis con células se utilizó el medio Roswell Park Memorial Institute (RPMI) 1640 marca Capricorn Scientific suplementado con 1% streptomycin/penicilina y 10% de suero fetal bovino (SFB) marca Capricorn Scientific.

## 3.3 Preparación de la muestra

Hojas deshidratadas de *Mentha x piperita L.*, *Peumus boldus Mol.* y *Baccharis trimera Less.* de uso comercial Cabral® (Montevideo, Uruguay), se trituraron con molinillo a una potencia de 130W y frecuencia de 50Hz durante 30 segundos, llegando a un tamaño de partícula fino. Una vez trituradas, las muestras se almacenaron a 4°C en frascos de vidrio.

## 3.4 Caracterización fisicoquímica de la materia prima

### 3.4.1 Contenido proteico total

La determinación del contenido proteico total de las hierbas, se realizó el análisis del contenido de nitrógeno total por el método 920.105 de Kjeldahl (N: 4.38) recomendado por la AOAC, 1990. Se masaron 0,8 gramos de muestra, y se introdujeron en tubos Kjeldahl junto a 7,8 gramos de catalizador (mezcla de 0.4/3.5g de sulfato de cobre y sulfato de potasio), 20mL de ácido sulfúrico concentrado y 20 gotas de siliconas. Los tubos se colocaron en un digestor, con extractor de gases y se incubó durante 1 hora y 45 minutos utilizando un gradiente de temperatura. Una vez terminado el tiempo de incubación, se apagó el digestor y se dejó enfriar las muestras hasta llegar a temperatura ambiente. Luego de la digestión, se procedió a la destilación de las muestras en un destilador Kjeldahl. Se adicionó a cada muestra 50mL de agua destilada, luego se colocó el tubo en el destilador, y se dispensó 100mL de NaOH 33%. En la placa colectora se colocó un matraz con 25mL de la solución de ácido bórico 4% y

dos o tres gotas de indicador mixto (azul de metileno 0,2% y rojo de metilo 0,2%), se notó un viraje del color verde al rosado por parte del indicador (lo que marca el pasaje del  $\text{NH}_4^+$  presente en la muestra a la solución de ácido bórico), a partir de ahí la destilación duró aproximadamente 3 minutos, luego se tituló con una solución de ácido clorhídrico de 0,1 o 0,5N previamente estandarizada.

El porcentaje de nitrógeno presente en la muestra se calculó según la siguiente ecuación:

$$\%N = \frac{G \times N \times 14}{10 \times T}$$

Donde G es el gasto, N es la normalidad de la solución de ácido clorhídrico y T es a toma de ensayo de la muestra en gramos.

Luego de realizado el cálculo del porcentaje de nitrógeno en la muestra, este valor se multiplicó por un factor (F) según sea la muestra para determinar el porcentaje de proteínas, en este caso F= 6,25.

$$\%P = \%N \times F$$

### 3.4.2 Contenido lipídico total

El contenido de lípidos totales se realizó mediante el método gravimétrico de Soxhlet (AOAC, 1990). Se colocaron 4 gramos de muestra en cartucho de papel filtro y éste dentro del extractor Soxhlet. Se colocó el extractor sobre un balón de fondo chato (previamente secado en estufa a 105°C durante 30 minutos y masado), se agregó una descarga y media del extractor de éter de petróleo (P.E. 60-80°C). El sistema se ensambló a un condensador y se colocó finalmente, sobre plancha calefactora donde se incubó durante 6 horas. Se ajustó el calor de la plancha para que la velocidad de condensación sea de unas 2-4 gotas por segundo. Una vez finalizada la incubación, se retiró el sistema de la plancha y se removió completamente el éter de los balones de recolección utilizando rotavapor, luego se colocó en estufa a 105°C por 15 minutos. Finalmente, se retiró el balón de la estufa, se dejó enfriar en desecador durante 15 a 20 minutos y se masó con el extracto etéreo.

### 3.4.3 Determinación de minerales por vía seca

La determinación de minerales por vía seca se realizó por incineración a  $500 \pm 15^\circ\text{C}$  (AOAC, 1990). Previamente, se incubaron los crisoles de porcelana durante 8 horas en mufla a 500°C. Luego de haber sido retirados, se dejaron enfriar en desecador y se masaron en balanza analítica. Se agregaron 3 gramos de muestra en cada crisol y se colocaron sobre llama hasta que dejó de emanar humo blanco, luego se incubaron en mufla a 500°C durante 12 horas. Nuevamente se retiraron, se dejaron enfriar en

dsecador y se masaron en balanza analítica. El contenido de minerales se calculó como:

$$\%Minerales = \left( \frac{m \text{ crisol y muestra final (g)} - m \text{ crisol inicial (g)}}{m \text{ muestra inicial (g)}} \right) * 100$$

#### 3.4.4 Contenido de fibra dietética total

La determinación de la fibra dietética total se realizó siguiendo el método enzimático de Prosky modificado (AOAC, 1990). 1 gramo de muestra se colocó en frascos específicos para filtro Tecator®, se añadió 50mL de buffer tampón fosfato ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4/\text{NaH}_2\text{PO}_4$ ) 0,08M y pH= 6, y 100µL de  $\alpha$ -amilasa y se homogeneizó bien. Se incubó durante 30 minutos en baño de agua a 95°C con agitación de 200 rpm. Al finalizar la incubación, se dejó enfriar los frascos, se ajustó el pH a  $7,5 \pm 0,2$  mL mediante el agregado de NaOH 0,275N. Inmediatamente antes del uso, se realizó una solución disolviendo 50mg de proteasa en 0,8mL de tampón fosfato, se agregó 100µL de dicha solución a cada frasco. Se volvió a incubar en baño de agua durante 30 minutos con agitación de 200 rpm, pero esta vez a 60°C. Nuevamente se dejó enfriar los frascos, y se ajustó el pH entre 4,0 y 4,5 agregando HCl 0,325N, seguidamente se agregó 100µL de amiloglucosidasa. Se incubó nuevamente en baño de agua durante 30 minutos con agitación de 200 rpm a 60°C. Una vez finalizada la incubación, se dejaron enfriar los frascos y se agregó 400mL de EtOH 95% a cada uno, se incubó durante toda la noche a temperatura ambiente.

Paralelamente, se muflaron crisoles de vidrio con 0,5mg de célite, durante 4 horas a 500°C.

Se lavó con EtOH 78% la célite presente en los crisoles, luego se colocaron en el filtro Tecator, con su frasco correspondiente. Se realizó la filtración, una vez que el residuo insoluble se recolectó en los crisoles, se los enjuagó dos veces con EtOH 78%, luego con EtOH 95%, y por último con acetona. Se incubaron los crisoles con el residuo en estufa de 105°C durante toda la noche, luego se dejaron enfriar en desecador y se masaron en balanza analítica.

Con la mitad de los crisoles se realizó la determinación de proteínas totales mediante Kjeldahl, como se detalla en el apartado 3.4.1. Con la otra mitad de los crisoles se realizó la determinación de minerales por vía seca, como se detalla en el apartado 3.4.3. Ambos valores se restaron al peso obtenido del residuo inicial.

#### 3.4.5 Contenido de humedad total

El contenido de humedad total se realizó mediante el método de destilación (AOAC, 1990), utilizando una trampa de agua Bidwell-Sterling conectada a un condensador. Se pesó 5 gramos de muestra y se los incubó a ebullición (temperatura mayor a 110,6°C) sobre plancha calefactora con 75mL de Tolueno durante 5 horas.

El contenido de humedad se obtuvo como sigue:

$$\%Humedad = \frac{V \text{ agua recolectado (mL)} \cdot 100}{g \text{ de muestra}}$$

### 3.4.6 Determinación de glúcidos totales

Los glúcidos totales se calcularon por diferencia:

$$\%Glúcidos = 100 - \%Proteína - \%Minerales - \%Lípidos - \%Humedad - \%Fibra$$

## 3.5 Preparación de los extractos

Las extracciones se realizaron con una proporción masa:volumen de 1:50, por maceración convencional (agua destilada 3 minutos a ebullición) y EtOH 95% (24 horas a temperatura ambiente); y mediante extracción asistida por ultrasonido utilizando potencia de 100W, frecuencia de 20Hz y pulsos de 10 segundos durante 1, 2 y 3 horas en los mismos solventes, manteniendo la temperatura de trabajo a  $25 \pm 5^\circ\text{C}$ . Los extractos obtenidos fueron filtrados, congelados y liofilizados durante 96 horas. Las muestras en etanol 95% luego de haber sido filtradas, se las rotavaporó con baño de agua a  $60^\circ\text{C}$  y se resuspendieron en agua destilada antes de congelarlas y liofilizarlas durante 96 horas.

## 3.6 Rendimiento de los extractos

El rendimiento de los extractos obtenidos luego de la liofilización se calculó según la siguiente ecuación:

$$\%Rendimiento = \frac{m\text{Extracto} \times 100}{m\text{Muestra}}$$

## 3.7 Determinación del contenido de polifenoles totales

La cantidad de polifenoles totales se determinó mediante el método de Folin-Ciocalteu según Slinkard & Singleton, 1977. Esta técnica se basa en una reacción de reducción/oxidación entre los polifenoles presentes en la muestra y el reactivo de Folin-Ciocalteu. Dicho reactivo contiene una mezcla de wolframato sódico ( $\text{Na}_2\text{WO}_4$ ) y molibdato sódico ( $\text{Na}_2\text{MoO}_4$ ) en ácido fosfórico, lo cual da lugar al ácido fosfomolibdotúngstico de color amarillo. Este ácido al ser reducido por los grupos fenólicos presentes en la muestra, origina un complejo de color azul, cuya intensidad es la que se mide para evaluar el contenido en polifenoles totales mediante espectrofotometría UV-Vis a 750nm.

Como estándar de referencia se utilizó ácido gálico. Para realizar la curva de calibración, se utilizaron concentraciones de ácido gálico patrón entre 0,05 y 1mg/mL. Las muestras o la solución patrón (10 $\mu\text{L}$ ) se mezclaron en el pocillo con 200 $\mu\text{L}$  de  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  20% en una placa de 96 pocillos, 2 minutos luego, se agregaron 50 $\mu\text{L}$  de

reactivo Folin-Ciocalteu diluido al quinto. Luego de incubar durante 30 minutos en oscuridad, las lecturas se realizaron a 750nm utilizando el lector de placas.

Los resultados se expresaron como mg equivalentes de ácido gálico (GAE)/g muestra seca.

### 3.8 Identificación y cuantificación de compuestos fenólicos

La identificación y cuantificación de los compuestos fenólicos presentes en los extractos de las hierbas, así como de los extractos una vez sometidos al proceso de simulación digestiva, se realizó mediante HPLC-DAD (con detector de arreglo de diodos), siguiendo el método propuesto por Reza et al., 2015. Se inyectaron 20µL de los extractos (o digeridos) a una concentración de 5mg/mL, las corridas tuvieron una duración total de 55 minutos, y un flujo de 1mL/min. La columna utilizada fue una C18 de 5µm y 4,6 x 250mm marca Phenomenex®, las longitudes de onda medidas fueron 285, 290 y 370nm. Se utilizó un programa de gradiente de fase móvil (tabla 3.8.1) con los siguientes solventes: acetonitrilo (C<sub>2</sub>H<sub>3</sub>N), metanol (CH<sub>3</sub>OH) y ácido fosfórico (H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>), de pH= 2,81.

**Tabla 3.8.1:** Gradiente de elución utilizado en las corridas de HPLC.

Tiempo (min)	0	10	20	30	45	47	50	55
ACN (%)	5	10	20	20	100	100	5	5
MeOH (%)	0	10	20	20	0	0	0	0
H <sub>3</sub> PO <sub>4</sub> (%)	95	80	60	60	0	0	95	95

Con base en la literatura consultada (Boualem et al., 2017; Klimaczewski et al., 2014; Mahdavi et al., 2017; Menezes et al., 2016; Zielinski et al., 2014), se decidió utilizar como patrones el ácido gálico (tiempo de retención (tr)=5,5426), el ácido cafeico (tr=12.668), el ácido clorogénico (tr=13.381), la rutina (tr=18.8088), la quercetina (tr=25.504) y un compuesto presente en mayor cantidad en el boldo llamado boldina (tr=4,1787), el cual se decidió identificar gracias a sus propiedades antioxidantes (Klimaczewski et al., 2014; Lau et al., 2013; O'Brien et al., 2006) anti-inflamatorias y neuro-protectoras (De Lima et al., 2016; Dhingra & Soni, 2018), su actividad regenerativa hepática (Bernadete et al., 2016), así como sus actividades antiparasitaria (Salama et al., 2017), antitumoral (Gerhardt et al., 2014; Kazemi Nouredini & Tanavar, 2015; Paydar et al., 2014), entre otras. Los tiempos de retención de cada compuesto patrón se hallaron realizando un promedio entre 6 corridas. Se cuantificaron utilizando curvas de calibración con concentraciones entre 0,01 y 1mg/mL.

### 3.9 Determinación de la actividad antioxidante

La actividad antioxidante de los extractos se determinó según dos métodos, midiendo la capacidad de barrido frente a radicales ABTS<sup>•+</sup> según Re et al., 1999; y también frente a radicales peróxilo, siguiendo el método llamado ORAC (*Oxygen radical absorbance capacity*), planteado por Ou et al., 2001 y modificado por Dávalos et al., 2003.

#### 3.9.1 Frente a radicales ABTS<sup>•+</sup>

Esta técnica se basa en la medida de la capacidad de los antioxidantes de atrapar los radicales catiónicos ABTS<sup>•+</sup> (color verde-azulado), formando el complejo reducido ABTS<sup>2-</sup> (incolore), reacción de reducción/oxidación entre los antioxidantes presentes en una muestra y el reactivo ABTS oxidado por el persulfato de potasio. Esta reacción se sigue midiendo la decoloración de la solución, mediante espectrofotometría UV-Vis a 750nm, utilizando como estándar de referencia el Trolox.

Para disolver las muestras, el reactivo ABTS y la curva de calibración se utilizó buffer fosfato salino (PBS) (5mM, pH=7,4). Para activar el reactivo ABTS (7mM), 44µL de persulfato de potasio (140mM) se agregaron a la solución inicial, y se incubó durante 16 horas en oscuridad. 10µL de muestra o Trolox se sembraron en una placa de 96 pocillos, brevemente se dispensaron 190µL de reactivo ABTS ajustado a una absorbancia de 0,7UA. Una vez completada la siembra de la placa, se incubó durante 10 minutos en oscuridad, y luego se leyó a 750nm utilizando el lector de placas. Los resultados se expresaron en µmoles de equivalentes de Trolox (TE)/ g muestra seca, utilizando una curva de calibración de Trolox con concentraciones entre 0,25 y 1,5mM. Los porcentajes de inhibición se calcularon con la siguiente ecuación:

$$\%Inhibición = \frac{A_{control} - A_{muestra}}{A_{control}} \times 100$$

Siendo  $A_{control}$  la absorbancia obtenida para el reactivo ABTS + buffer, mientras que la  $A_{muestra}$  es la obtenida para el reactivo ABTS + muestra o Trolox.

#### 3.9.2 Frente a radicales peróxilo (ORAC)

Esta técnica consiste en utilizar una sonda fluorescente que es oxidada por el AAPH (generador de radicales peróxilo) disminuyendo así su intensidad de fluorescencia. Al estar ésta en presencia de un compuesto antioxidante (patrón o muestra) no se degrada, manteniendo su intensidad de fluorescencia constante. En este ensayo también se utiliza el Trolox como estándar de referencia.

Los extractos de hierbas fueron dispersados en PBS (75mM, pH=7,4), a una concentración final de aproximadamente 0,04 mg/mL. Se utilizaron soluciones con concentraciones entre 0,1 y 0,8nM para realizar la curva de calibración. El blanco

consistió en buffer fosfato en vez de antioxidante. La solución de fluoresceína se solubilizó en buffer y se incubó a 4°C en oscuridad, la solución de AAPH 48mM en buffer se preparó el mismo día y se almacenó a 4°C hasta el momento de su uso. 20µL de muestra o Trolox se sembraron en una placa de 96 pocillos, seguido de 120µL de fluoresceína (0,117µM). La primera lectura se realizó luego de los 10 minutos de incubación de la placa a 37°C en oscuridad (f<sub>0</sub>). Brevemente, luego de la adición de 60µL de AAPH, una lectura por minuto (f<sub>i</sub>) durante 104 minutos en total se llevó a cabo en un lector de fluorescencia utilizando una λ de excitación de 485nm y una λ de emisión de 520nm. Las medidas de fluorescencia se normalizaron utilizando el blanco, luego se calculó el área bajo la curva del decaimiento de la intensidad de la fluorescencia (AUC) con la siguiente ecuación:

$$AUC = 1 + \sum_{i=1}^{i=104} \frac{f_i}{f_0}$$

Los resultados se expresaron como equivalentes de Trolox (µmoles TE/ g muestra seca).

### 3.10 Determinación de la actividad antiglicante

La capacidad antiglicante se determinó por seguimiento de los compuestos fluorescentes formados por la glicación de proteínas *in vitro* de los extractos, utilizando la metodología propuesta por Brownlee et al., 2011. El sistema modelo utilizado es el de suero albúmina bovina (BSA), metilglioxal (MGO) y las muestras en estudio (extractos de hierbas). A su vez, se comparó el poder inhibitorio de las mismas con un inhibidor conocido de la reacción como lo es la aminoguanidina (AG), se realizó una curva de calibración con valores de concentración entre 0,0005 y 0,1mol/L. Se diseñaron 5 sistemas por cuatuplicado, la mitad se almacenaron brevemente luego de haberlos homogeneizado conformando la tanda en la que no ocurre la reacción (Día 0), y el resto se incubó durante 7 días a 37°C (Día 7). Los sistemas fueron los siguientes:

- 1) Control negativo (C-): 500µL BSA (concentración final de 1mg/mL) + 500µL PBS
- 2) Control positivo (C+): 500µL BSA + 8µL MGO (concentración final de 5mM) + 492µL PBS
- 3) Control de la fluorescencia intrínseca de la muestra (CI): 100µL muestra + 900µL PBS
- 4) Aminoguanidina (AG): 500µL BSA + 8µL MGO + 100µL AG (concentración variable) + 392µL PBS
- 5) Muestra: 500µL BSA + 8µL MGO + 100µL muestra + 392µL PBS

Una vez finalizada la incubación, 200µL de cada sistema se sembraron en una placa de 96 pocillos y se midió la fluorescencia utilizando una  $\lambda$  de excitación de 360nm y una  $\lambda$  de emisión de 420nm, así como un barrido ajustando su  $\lambda$  de excitación a 280nm y su  $\lambda$  de emisión desde 340 a 500nm, utilizando el lector de placas de fluorescencia. El porcentaje de inhibición de la reacción de glicación se calculó según:

$$\%Inhibición\ de\ glicación = 1 - \frac{F(muestra) - F(CI)}{F(C+)} \times 100$$

Siendo  $F_{intrínseca}$  la fluorescencia que presenta el extracto de hierba incubado solo.

Se realizaron además las curvas dosis-respuesta de las muestras, expresando los resultados como valores de IC50 en µg/mL, lo cual corresponde a la concentración de extracto necesaria para ocasionar una disminución del 50% de la reacción de glicación.

### 3.11 Ensayo *in vitro* de actividad anti-inflamatoria

Se utilizó la línea reportera HT-29-NF- $\kappa$ B-GFP procediendo según Mastropietro et al., 2015, y trabajando con medio de cultivo RPMI adicionado con 1% de streptomicina/penicilina y 10% de suero fetal bobino (SFB). Se sembraron 50.000 células por pocillo en placa de 96 pocillos y se incubaron durante 24 horas a 37°C y 5% de CO<sub>2</sub>.

Los extractos acuosos se prepararon a diferentes concentraciones en medio de cultivo RPMI suplementado como se detalla anteriormente. Como análisis preliminar se utilizó un rango de concentraciones finales muy amplio: 5, 0,5, 0,05 y 0,005 mg/mL. Las diferentes soluciones debieron filtrarse con filtro de poro 22 µm dentro de la cabina de flujo para asegurar su esterilidad.

Luego de la incubación, se descartó el medio de cultivo, y se sembraron 170µL de medio de cultivo con 20µL de muestra. Se incubó durante 6 horas a 37°C y 5% de CO<sub>2</sub>. Pasado ese tiempo, se dispensaron 10 µL de TNF- $\alpha$  (concentración final de 1 ng/mL) o medio (dependiendo del pocillo) y se dejó incubando bajo las mismas condiciones antes mencionadas durante 18 horas. Se realizaron dos controles: células solas y células + TNF- $\alpha$ .

Una vez finalizada la última incubación, se colectó el sobrenadante y se dispensaron 50 µL de Tripsina por pocillo, se colocó nuevamente en la estufa y se dejó incubar por 5-8 minutos. Luego, se agregaron 200 µL de PBS suplementado con 10% de SFB. Se analizó por citometría de flujo a una intensidad de fluorescencia para la GFP. Inmediatamente antes de realizar las lecturas en el citómetro, se pasó el contenido de cada pocillo a un tubo de citómetro y se le agregaron 2 µL de yoduro de propidio (250 µM) a cada tubo para evaluar la viabilidad celular.

La determinación de la actividad anti-inflamatoria luego de haber sometido los extractos al proceso de simulación digestiva se realizó utilizando las siguientes concentraciones finales: 0,05, 0,005 y 0,001 mg/mL. El procedimiento realizado fue el

detallado anteriormente. Los controles utilizados fueron: células solas, células + TNF- $\alpha$ , otro correspondiente al blanco de digestión (sales utilizadas durante el proceso de digestión) y el último correspondiente al extracto sometido al proceso de simulación digestiva.

Los resultados se normalizaron con respecto a TNF- $\alpha$  (tomado como 100% de actividad de NF- $\kappa$ B) y se graficaron como promedio  $\pm$  desviación estándar ( $n=9$ ).

Para cada muestra, se tomaron en cuenta 10.000 eventos determinados por una sección seleccionada en un gráfico dot plot FSC vs. SSC. Se seleccionaron únicamente las células vivas (células que excluyeron el ioduro de propidio).

### 3.12 Estudios de bioaccesibilidad

Para evaluar la bioaccesibilidad de los compuestos bioactivos se realizó un estudio de simulación digestiva según Hollebeeck et al., 2013. Este ensayo busca simular las diferentes condiciones a las que los alimentos son sometidos durante el proceso de digestión, recreando los diferentes pHs y agregando las enzimas presentes en cada tramo del tracto gastrointestinal.

Se divide en tres etapas: la primera es la etapa salivar, donde 0,3 gramos de extracto se masaron en balanza analítica y se colocaron en un matraz Erlenmeyer de 50mL, se le agregaron 10mL de PBS (10mM pH= 6,9) y 430 $\mu$ L de  $\alpha$ -amilasa, luego se dejó incubar durante 5 minutos. La segunda etapa es la gástrica, consiste en un sistema cerrado, ajustando el pH a 2 (utilizando HCl 1M) hasta llegar a un volumen final de 22,88mL, a su vez se le agregó 1,5mg de pepsina y se dejó incubar durante 90 minutos. La tercera y última etapa es la duodenal, siendo también un sistema cerrado en el cual el pH se volvió a ajustar a 7 (utilizando NaHCO<sub>3</sub> 1M) hasta llegar a un volumen final de 30,24mL, se agregaron 9,2mg de pancreatina y 55,2mg de bilis y se dejó incubar durante 150 minutos. Cada etapa se incubó a 37°C con agitación constante. Luego se centrifugó a 9500 rpm durante 20 minutos y el sobrenadante se liofilizó durante 96 horas.

### 3.13 Capacidad inhibitoria de la glicación con fructosa a nivel del tracto gastrointestinal

En este ensayo se utilizó el extracto con mejores características y se prosiguió según Bains & Gugliucci, 2017. Este ensayo tiene como objetivo comprobar si se da la formación de compuestos AGEs a nivel gastrointestinal entre proteínas (en este caso la BSA) y la fructosa ingerida con la dieta, y a su vez determinar si esta reacción se ve o no disminuida por la presencia de los extractos. Para ello, se diseñaron los mismos sistemas y se procedió de igual forma que en el apartado 3.9, con la salvedad que el MGO fue sustituido por fructosa (concentración final de 500mM), y la concentración final de BSA utilizada fue de 10mg/mL. La concentración utilizada de extracto fue de

5mg/mL. Los sistemas luego de haber sido homogeneizados se sometieron al proceso de simulación digestiva, suprimiendo la primera etapa (salivar).

### 3.14 Preparación de la HDL

La HDL (d= 1,063 - 1,210 g/L), se purificó mediante ultracentrifugación secuenciada, partiendo de un pool de suero humano de 30 voluntarios sanos (n=30) (Gugliucci et al., 2013). La extracción del suero fue realizada bajo consentimiento de los participantes. El estudio fue aprobado por Touro University California, IRB # 2013-069.

### 3.15 Ensayos de oxidación de la HDL

La cinética de la actividad arilesterasa de la paraoxonasa-1 (PON-1), se determinó siguiendo la aparición de fenol originado por la catálisis del fenilacetato mediante seis lecturas a 270nm durante 1 minuto según lo planteado por Menini et al., 2007.

La HDL purificada se diluyó en buffer Tris de 20mM y pH= 8 conteniendo 1mM de CaCl<sub>2</sub>, a una concentración proteica final de 1mg/mL. Se incubó en presencia o ausencia de generador hidrofílico de radicales libres AAPH (concentración final de 2mM), o SIN-1 a una concentración final de 0,1mM, a 37°C durante 3 horas. Asimismo, se incubó estas muestras en presencia o ausencia de extractos de hierbas (concentraciones de 0,01 a 0,5 mg/mL). Los volúmenes utilizados de cada solución para los diferentes sistemas se muestran en la tabla 3.15.1, para el armado de los sistemas primero se dispensó el agente oxidante, luego la HDL y por último la muestra. Luego de la incubación, las muestras se incubaron durante 10 minutos (o hasta su análisis) en un freezer a -80°C. Las medidas se realizaron en lector de placas BioTek®.

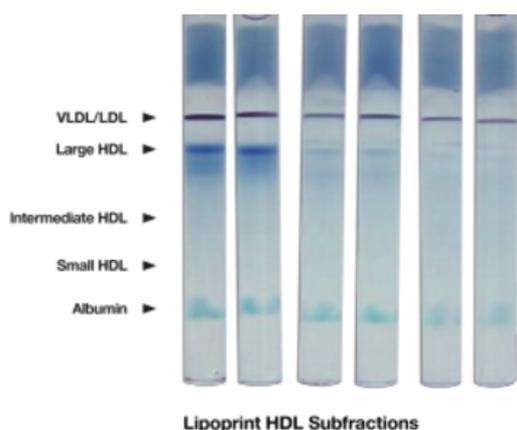
**Tabla 3.15.1:** Sistemas elaborados para cada ensayo con los volúmenes determinados para cada caso.

	HDL	AAPH	SIN-1	Hierba	Buffer
<b>Control color</b>	-	-	-	10 µL	120 µL
<b>Control HDL</b>	100 µL	-	-	-	30 µL
<b>Control AAPH/SIN-1</b>	100 µL	20 µL	20 µL	-	10 µL
<b>AAPH/SIN-1 + H + HDL</b>	100 µL	20 µL	-	10 µL	-

#### 3.15.1 Acercamiento al análisis estructural de la población de partículas de HDL

Se sembraron en los geles de poliacrilamida (tubos) 25µL de suero o 35µL de muestra (utilizadas para evaluar la inhibición de la oxidación de la PON-1), así como 300µL de

buffer de corrida de condiciones nativas. Las muestras incubadas fueron suero, HDL purificada, HDL en presencia de AAPH, y HDL en presencia de AAPH y los extractos acuosos y etanólicos de cada hierba. La corrida se realizó a 500V durante 50 minutos con un amperaje de 3mA por tubo. Las diferentes bandas de HDL (subclases) se determinaron según su movilidad (Rf), utilizando como referencias utilizadas en la corrida fueron las partículas más voluminosas de VLDL y LDL, y la proteína albúmina (marcador del frente de corrida) (figura 3.15.2.1). El área relativa de cada subclase HDL se determinó y multiplicó por la concentración de colesterol HDL total de la muestra, para obtener la cantidad de colesterol para cada banda en mg/dL.



**Figura 3.15.1.1:** Patrón de separación para suero de los geles de Lipoprint utilizados.

### 3.16 Análisis estadístico

Todos los análisis mencionados se realizaron al menos por triplicado. El análisis de los resultados se realizó mediante análisis de la varianza (ANOVA) y se consideró diferencias significativas con niveles de significación de 0,05. Cuando existieron diferencias significativas se aplicó el ensayo de comparación de medias de Tukey. Las diferencias significativas entre las muestras se agruparon utilizando diferentes letras.

## 4 Resultados y discusión

### 4.1 Caracterización fisicoquímica de la materia prima

Los resultados obtenidos de la caracterización fisicoquímica de las hierbas *Mentha x piperita L.*, *Peumus boldus Mol.* y *Baccharis trimera Iless.* se expresaron como porcentaje en base seca de proteínas, lípidos, cenizas, fibra y glúcidos (tabla 4.1.1).

**Tabla 4.1.1:** Resultados obtenidos de las determinaciones realizadas para la caracterización fisicoquímica en base seca de las hierbas con sus respectivas desviaciones estándar expresadas en porcentaje.

	<b>Menta</b>	<b>Boldo</b>	<b>Carqueja</b>
<b>Proteínas</b>	15,36 ± 0,43	6,47 ± 0,08	5,63 ± 0,08
<b>Lípidos</b>	2,96 ± 0,06	5,77 ± 0,48	4,29 ± 0,02
<b>Cenizas</b>	11,59 ± 0,03	15,72 ± 0,92	5,44 ± 0,49
<b>Fibra</b>	36,53 ± 0,33	41,58 ± 0,82	50,70 ± 2,98
<b>Glúcidos</b>	25,07 1,85	19,94 ± 3,12	26,24 ± 3,98

Nota: resultados expresados como promedio ± desviación estándar (n=3).

Las tres hierbas están compuestas en su mayoría por fibra (polisacáridos excluyendo el almidón), llegando a valores de hasta el 51% como en el caso de la carqueja. Este gran contenido de fibra puede dificultar la extracción de compuestos polifenólicos debido a su interacción con los mismos, disminuyendo así el rendimiento del proceso. Comparando las hierbas entre sí, podemos apreciar que el porcentaje de proteínas presente en la menta es significativamente mayor ( $\alpha \leq 0,05$ ) que el que hay en el resto de las hierbas.

### 4.2 Rendimiento de los extractos

Los resultados de rendimiento obtenidos para los extractos de las hierbas *Mentha x piperita L.*, *Peumus boldus Mol.* y *Baccharis trimera Iless.* se presentan en la tabla 4.2.1.

**Tabla 4.2.1:** Valores de porcentaje obtenidos para el rendimiento de extracción en cada caso. Las letras indican las diferencias significativas entre los diferentes extractos de las diferentes hierbas en el mismo solvente y mismo tratamiento.

		Rendimiento (%)	
		Agua dest.	EtOH
Sin US	Menta	27 ± 1 b	8 ± 1 a
	Boldo	25 ± 2 b	15 ± 1 b
	Carqueja	19 ± 2 a	10 ± 1 a
US 1 h	Menta	39 ± 2 b	33 ± 2 b
	Boldo	29 ± 2 a	21 ± 1 a
	Carqueja	28 ± 3 a	33 ± 1 b
US 2 h	Menta	37 ± 1 b	31 ± 2 b
	Boldo	29 ± 1 a	21 ± 2 a
	Carqueja	40 ± 2 b	34 ± 1 b
US 3 h	Menta	42 ± 2 b	14 ± 3 a
	Boldo	33 ± 2 a	24 ± 2 b
	Carqueja	30 ± 3 a	18 ± 2 a

Nota: resultados expresados como promedio ± desviación estándar (n=5).

En el caso de los extractos en agua destilada hirviendo se obtuvieron rendimientos significativamente mayores ( $\alpha \leq 0,05$ ) luego de liofilizar. Se obtuvo aproximadamente un cuarto del valor de masa original de muestra utilizada para la menta y el boldo, y un quinto en el caso de la carqueja. Con respecto a los extractos realizados en etanol 95% el rendimiento fue menor, significando un décimo del valor de masa original de muestra utilizada para la menta y la carqueja, y un séptimo para el boldo.

Con respecto a los extractos con aplicación de US, para las tres hierbas se obtuvieron rendimientos mayores que sin la aplicación del mismo en ambos solventes, lo que sugiere una mayor extracción de compuestos de interés con propiedades bioactivas.

### 4.3 Determinación del contenido de polifenoles totales

Con respecto a la cantidad de polifenoles totales, en la tabla 4.3.1 pueden verse los valores de concentración obtenidos para todos los extractos.

**Tabla 4.3.1:** Valores de concentración de polifenoles totales obtenidos para los extractos sin aplicación de ultrasonido (US), expresados en mg GAE/g muestra. Las letras indican las diferencias significativas entre los extractos de las diferentes hierbas en el mismo solvente.

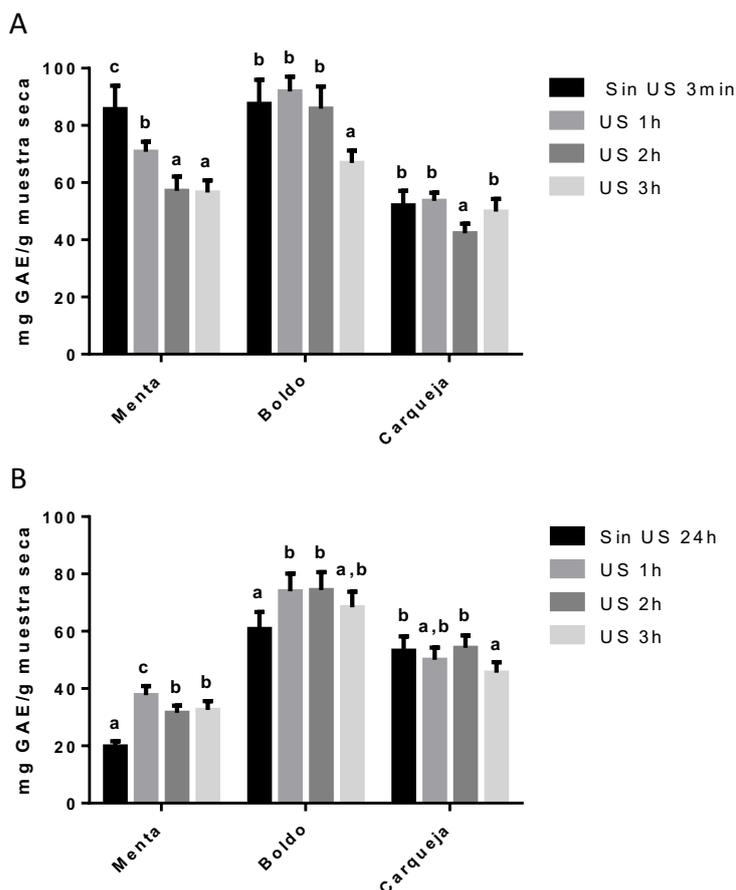
	Agua destilada			EtOH 95%		
	Menta	Boldo	Carqueja	Menta	Boldo	Carqueja
Sin US	86 ± 8 b	88 ± 8 b	52 ± 5 a	20 ± 2 a	61 ± 6 b	53 ± 5 b

Nota: resultados expresados como promedio ± desviación estándar (n=10).

Los resultados indican que en el caso de los extractos acuosos, las hierbas que mayor contenido de polifenoles presentaron fueron la menta y el boldo, no encontrándose diferencias significativas entre ellas ( $\alpha \leq 0,05$ ). Con respecto al resultado hallado para el extracto acuoso de boldo, Soto et al., 2014 encontraron que la cantidad de polifenoles obtenidos fue de  $34,3 \pm 2,1$  mg GAE/g muestra seca, cabe destacar que en ese trabajo utilizaron agua a  $90^{\circ}\text{C}$  ( $5^{\circ}\text{C}$  menos que la utilizada en este trabajo), además utilizaron hojas enteras de la hierba, no redujeron el tamaño de partícula lo suficiente como para lograr una mejor extracción de los compuestos. A su vez, Sabir et al., 2017, encontraron que también en extractos acuosos realizados con hojas enteras de carqueja, el valor obtenido de contenido de polifenoles fue de  $14,1 \pm 0,6$  mg GAE/g muestra seca, siendo nuevamente menor al aquí obtenido debido al tamaño de partícula. En el caso de la menta, extractos acuosos de hojas molidas mediante molinillo (como lo realizado en este estudio) a temperatura ambiente durante 48h resultaron presentar  $40,7$  mg GAE/g muestra seca según Mahdavia et al., 2017. En ese estudio utilizó una relación de muestra de 1:10, sin embargo, la temperatura de extracción de  $25^{\circ}\text{C}$  resulta menos eficaz a la hora de extraer este tipo de compuestos ya que el valor obtenido en el mencionado estudio fue menor al obtenido en el presente trabajo ( $86 \pm 8$  mg GAE/g muestra seca). Resultados similares en la relación de contenido de polifenoles totales para las mismas hierbas en extracciones acuosas pueden encontrarse en el estudio realizado por Ferreira Zielinski et al., 2014.

Los resultados obtenidos para las muestras en etanol 95% resultan concordantes con otros estudios realizados, en el caso de la menta Ramkissoon et al., 2013 encontró que para extractos 1:10 en etanol 50% durante 1 semana el valor de polifenoles totales fue de  $14,51 \pm 0,08$  mg GAE/g muestra, cercano al que se obtuvo en este trabajo. Asimismo, para el boldo el valor obtenido para extractos 1:20 en 96% etanol fue de aproximadamente 50 mg GAE/g muestra, lo que también se acerca al valor aquí obtenido (Soto et al., 2014). Para el extracto de carqueja, el valor de polifenoles totales adquirido por Anderson Assaid et al., 2013 fue de aproximadamente 40,3 mg GAE/g muestra, lo cual es similar al que se presenta en este estudio.

En la figura 4.3.1 (A y B) se presentan los mismos resultados graficados junto a los obtenidos para los extractos con aplicación de ultrasonido (US).



**Figura 4.3.1:** Concentración de polifenoles totales expresados en mg GAE/ g muestra para cada extracto en agua destilada (A) o en EtOH 95% (B). Los valores se expresan como promedio  $\pm$  desviación estándar,  $n = 20$ . Las letras señalan los valores significativamente diferentes de concentración entre las hierbas del mismo tipo de extracto.

En el caso de los extractos con agua destilada como solvente (A), puede verse que para todos los tiempos de aplicación, el US no logra aumentar la cantidad de polifenoles totales extraídos, viéndose reflejado en que el valor obtenido para los extractos sin US no son significativamente diferentes a los extractos con una hora de ultrasonido, llegando los valores de 3 horas de US a ser incluso los más bajos en el caso de la menta y el boldo y el de 2 horas de aplicación el más bajo en el caso de la carqueja. Por lo que puede concluirse que la aplicación de US (ya sea una, dos o tres horas), no aumenta la cantidad de polifenoles totales obtenidos para los extractos acuosos concordando con el resultado obtenido por Žlabur et al., 2016, donde no encuentran mejoras en la extracción de compuestos fenólicos con la aplicación de US en extractos acuosos de menta y toronjil. A su vez, estos resultados no concuerdan con la idea planteada en el apartado 4.2, en que el rendimiento significativamente mayor ( $\alpha \leq 0,05$ ) obtenido para los extractos con aplicación de US presentan mayor cantidad de compuestos polifenólicos. Los extractos en etanol 95%, sin embargo, puede verse que los que fueron realizados con una hora de US (a excepción de la carqueja) son los que mayor

cantidad de polifenoles presentaron, siendo los extractos sin esta técnica los que resultaron presentar la menor cantidad de estos compuestos en el caso de la menta y el boldo. Considerando a estas últimas, la mayor concentración de polifenoles totales se encontró en los extractos de 1 y 2 horas de US, llegando en el caso de la menta al doble del contenido de polifenoles comparado con el extracto sin US. En el caso de la carqueja, no se ven diferencias significativas ( $\alpha \leq 0,05$ ) entre los diferentes tiempos de aplicación del US, llegando incluso a presentar valores menores. Con estos datos se puede concluir que en el caso de la menta y el boldo en etanol, los mejores extractos en cuanto a cantidad de polifenoles totales resultaron ser los de 1 hora de aplicación, sin embargo en el caso de la carqueja no se vieron diferencias significativas entre el extracto sin US y los que fueron realizados con dicha técnica.

Comparando en la figura 4.3.1 todos los extractos de cada hierba entre sí, puede verse que en el caso de los extractos acuosos (A), el boldo y la menta son las hierbas que presentan la mayor cantidad de polifenoles totales, esto puede deberse a la estructura físicoquímica de la carqueja. Como se vio en el apartado 4.1, esta hierba presenta mucha fibra (cerca del 50%), por lo que puede dificultar la eficacia de la extracción de compuestos de interés dada la interacción de dicha fibra con los mismos. Sin embargo, en el caso de los extractos en EtOH (B), se ve que la carqueja presenta en todos los casos mayor cantidad de polifenoles totales que la menta, aun así la hierba que presenta mayor cantidad de estos compuestos es el boldo, esto puede deberse a que la naturaleza de los polifenoles presentes en estas hierbas sea preferentemente hidrófoba, logrando extraerse más fácilmente en etanol. La menta fue la hierba que menor cantidad de polifenoles totales presentó en todas las diferentes extracciones etanólicas, dado que este patrón no se repitió en los extractos acuosos, podemos deducir que los compuestos presentes en la menta son mayoritariamente hidrofílicos. Con respecto al contenido de polifenoles totales, se podría concluir que la hierba con mayor cantidad de estos compuestos, tanto en extractos acuosos como etanólicos, fue el boldo.

## 4.4 Determinación de la actividad antioxidante

La actividad antioxidante de los extractos se midieron mediante dos métodos diferentes: frente a radicales artificiales ABTS<sup>•+</sup> y frente a radicales peroxilo mediante el método de ORAC. Los resultados de ambos ensayos arrojaron que los extractos poseen una gran capacidad antioxidante por ambos métodos.

### 4.4.1 Frente a radicales ABTS<sup>•+</sup>

En la tabla 4.4.1.1 se resumen los valores en  $\mu\text{moles Trolox/g}$  muestra obtenidos para los extractos sin aplicación de US para el ensayo de ABTS.

**Tabla 4.4.1.1:** Resultados obtenidos de actividad antioxidante frente a radicales ABTS<sup>•+</sup>, expresados en  $\mu\text{moles TE/g}$  muestra para los extractos sin aplicación de US. Las letras indican las diferencias significativas entre los diferentes extractos de la misma hierba en el mismo solvente con diferente tratamiento.

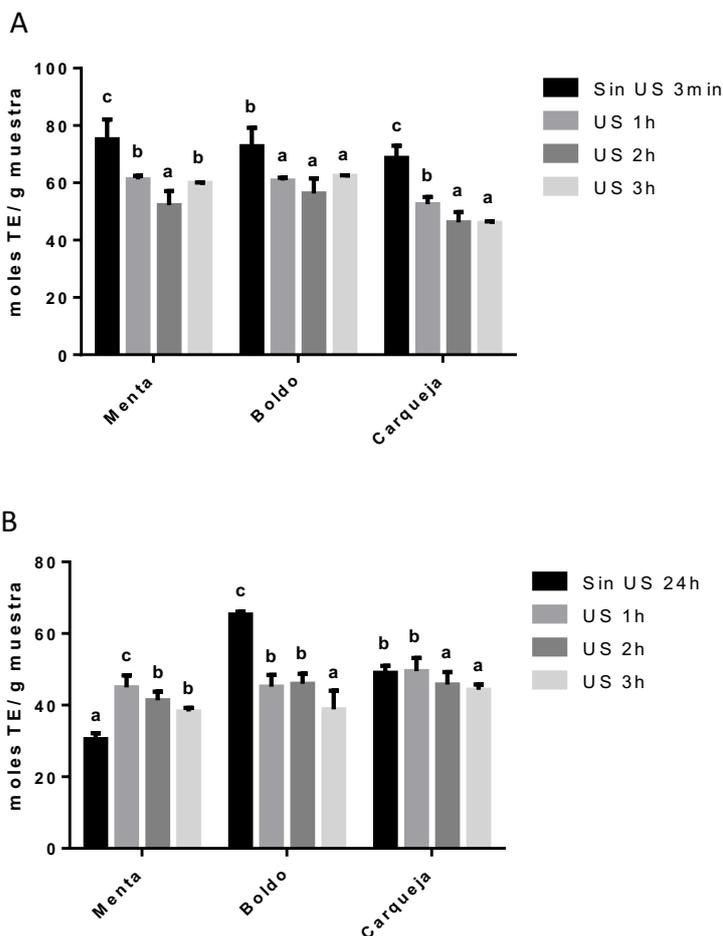
	Agua destilada			EtOH 95%		
	Menta	Boldo	Carqueja	Menta	Boldo	Carqueja
<b>Sin US</b>	$75 \pm 5$ a	$73 \pm 6$ a	$69 \pm 4$ a	$31 \pm 2$ a	$65,3 \pm 0,8$ c	$49 \pm 2$ b

Nota: resultados expresados como promedio  $\pm$  desviación estándar (n=10).

Los resultados obtenidos para el ensayo de actividad antioxidante mediante el método de ABTS para los extractos acuosos, señala que todas las hierbas presentan la misma actividad antioxidante, no detectándose diferencias significativas entre ellas ( $\alpha \leq 0,05$ ). Horžić et al., 2009 encontró valores de actividad antioxidante mediante el método de ABTS entre  $1047 \pm 4$  y  $72 \pm 2$   $\mu\text{moles TE/g}$  muestra seca (té verde y tilo, respectivamente), para infusiones acuosas de varias hierbas con una relación masa/agua de 1:10.

Con respecto a los extractos etanólicos, se ve que muestran una relación directa con aquellos obtenidos para la cantidad de polifenoles totales, siendo los extractos con mayor cantidad de polifenoles los que mayor actividad presentan. Esto refleja que la mayoría de la actividad antioxidante que presentan estos extractos proviene de dichos compuestos. El boldo es el extracto etanólico que mayor actividad antioxidante frente a radicales ABTS<sup>•+</sup> presentó. Los valores de actividad antioxidante de los extractos etanólicos obtenidos en este trabajo concuerdan con los que presentaron Gramza-Michałowska et al., 2008, en el cual el mayor valor de actividad antioxidante frente a radicales ABTS<sup>•+</sup> lo presentó el extracto etanólico (95%) de romero con  $58,05$   $\mu\text{moles TE/g}$  muestra, mientras que el menor lo presentó el tomillo con  $27,97$   $\mu\text{moles TE/g}$  muestra, entre otras hierbas. En este caso, incluso, el extracto de boldo presenta un mayor valor a los reportados en el citado trabajo.

En la figura 4.4.1.1, se presentan graficados los resultados obtenidos para todos los extractos, incluso los obtenidos con aplicación de US.



**Figura 4.4.1.1:** Actividad antioxidante frente a radicales ABTS<sup>•+</sup> expresados en  $\mu$ moles Trolox/ g muestra para todos los extractos en agua destilada (A) o en EtOH 95% (B). Los valores se expresan como promedio  $\pm$  desviación estándar, n= 20. Las letras señalan los valores significativamente diferentes de actividad entre los diferentes extractos de cada hierba.

En el caso de los extractos acuosos, los que presentaron mejor actividad antioxidante frente a radicales ABTS<sup>•+</sup> fueron los que no fueron sometidos a tratamiento con US, presentando en todos los casos diferencias significativas con el resto de los valores de actividad antioxidante obtenidos para los extractos con diferentes tiempos de aplicación de US. Estos datos concuerdan nuevamente con el obtenido por Žlabur et al., 2016, donde los extractos acuosos con aplicación de US de hojas de menta y toronjil no presentan valores significativamente mayores de actividad antioxidante frente a este tipo de radicales. Los extractos acuosos sin aplicación de US de este trabajo presentaron valores dentro del rango, así como un poco por debajo (carqueja). Con respecto a los resultados obtenidos para los extractos etanólicos, en el caso de la menta el extracto que presentó mayor actividad antioxidante fue el de una hora de US, para la carqueja fueron el que no se sometió a US y el de una hora de aplicación, no mostrando diferencias significativas entre ellos pero sí al compararlos con los extractos de 2 y 3 horas de US ( $\alpha \leq 0,05$ ). El extracto de boldo que presentó significativamente mayor ( $\alpha \leq 0,05$ ) actividad antioxidante fue el realizado sin aplicación de US.

Como conclusión de este apartado, el único caso en que la aplicación de US resultó mejorar significativamente ( $\alpha \leq 0,05$ ) la actividad antioxidante frente a radicales ABTS<sup>•+</sup> fue para la menta en etanol 95%. Este resultado coincide con el obtenido para cantidad de polifenoles totales y tampoco parece alinearse al concepto planteado en el apartado 4.2 de que un mayor rendimiento de extracción significa mayor cantidad de compuestos de interés con actividad bioactiva.

#### 4.4.2 Frente a radicales peroxilo

Con respecto a la actividad antioxidante que presentan los extractos frente a radicales peroxilo, los resultados arrojaron datos similares a los que se presentaron anteriormente, ya sea para la actividad antioxidante frente a radicales ABTS<sup>•+</sup> o para la cantidad de polifenoles totales. En la tabla 4.4.2.1 se presentan los resultados obtenidos para los extractos obtenidos sin aplicación de US, expresados en  $\mu$ moles Trolox/ g muestra.

**Tabla 4.4.2.1:** Resultados obtenidos de actividad antioxidante frente a radicales peroxilo, expresados en  $\mu$ moles Trolox/ g muestra seca para los extractos sin aplicación de US. Las letras indican las diferencias significativas entre las diferentes hierbas en el mismo solvente.

	Agua destilada			EtOH 95%		
	Menta	Boldo	Carqueja	Menta	Boldo	Carqueja
Sin US	116 ± 1 b	115 ± 9 b	64 ± 6 a	11,2 ± 0,9 a	53 ± 3 b	100 ± 3 c

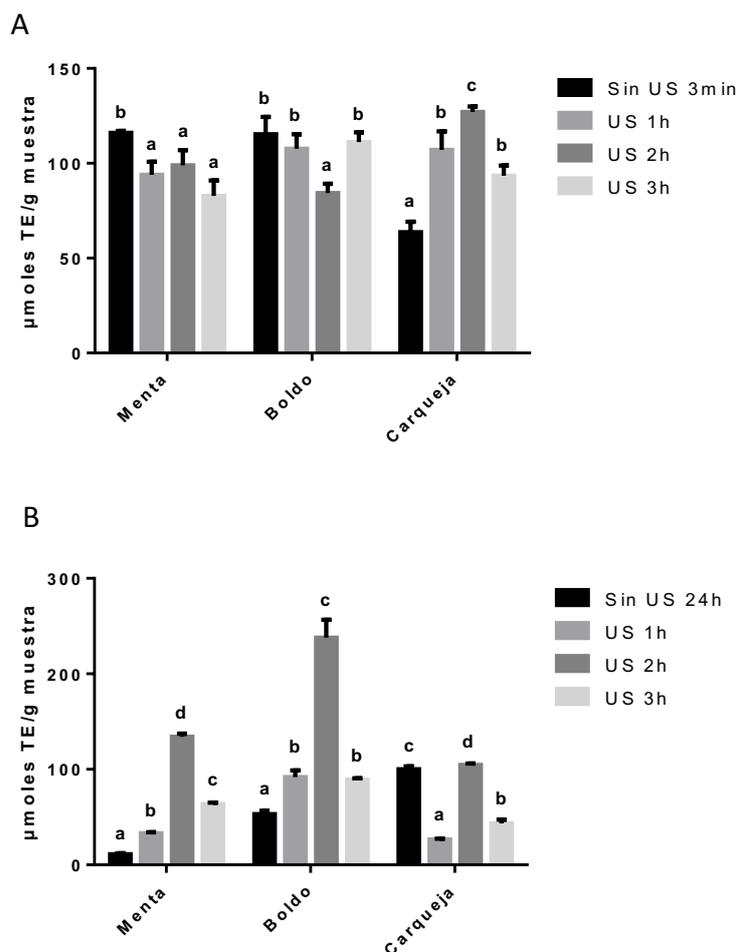
Nota: resultados expresados como promedio  $\pm$  desviación estándar (n=6).

Los valores de actividad obtenidos para los extractos en todos los casos son similares a los que obtuvieron Zheng & Wang, 2001, los cuales realizaron extractos 1:7,5 en buffer fosfato 75mM y pH 7 de una gran cantidad de hierbas, obteniendo valores de actividad antioxidante frente a radicales peroxilo entre  $1,88 \pm 0,05$  y  $92,18 \pm 0,72$   $\mu$ moles Trolox/ g muestra (aloe vera y orégano mexicano, respectivamente).

En el caso de los extractos de hierbas en agua destilada, estos resultados son iguales para los tres ensayos anteriormente mencionados, advirtiendo una relación directa entre el contenido de polifenoles y la actividad antioxidante de los extractos frente a los dos tipos de radicales. La relación presente entre las hierbas en este tipo de extracción también se encontró en el estudio realizado por Ferreira Zielinski et al., 2014, citado anteriormente dado que la relación de cantidad de compuestos fenólicos entre extractos fue similar a la obtenida en este estudio.

En el caso de los extractos en etanol 95%, los resultados fueron bastante similares entre ellos con excepción del extracto de carqueja, el cual parece presentar más actividad antioxidante frente a radicales peroxilo que las otras hierbas, sugiriendo una extracción de compuestos más activos frente a radicales peroxilo.

En la figura 4.4.2.1 se presentan graficados los resultados obtenidos para todos los extractos realizados, incluyendo los obtenidos mediante aplicación de US.



**Figura 4.4.2.1:** Actividad antioxidante frente a radicales peroxilo expresados en  $\mu$ moles Trolox/g muestra para todos los extractos en agua destilada (A) o en EtOH 95% (B). Los valores se expresan como promedio  $\pm$  desviación estándar,  $n=20$ . Las letras señalan los valores significativamente diferentes de actividad entre los diferentes extractos de cada hierba.

Con respecto a los extractos acuosos, el de carqueja con dos horas de US y los de menta y boldo sin US fueron los que presentaron una mayor actividad frente a radicales peroxilo. Parece ser que en estos casos, la carqueja es la única hierba en que aplicando US puede obtenerse una mayor actividad antioxidante contra radicales peroxilo.

En el caso de los extractos etanólicos, para las tres hierbas puede observarse un aumento en la actividad antioxidante contra radicales peroxilo a medida que se aumenta el tiempo de uso del US hasta las dos horas. El extracto de boldo con dos horas de US fue el que presentó una mayor actividad mientras que el de menta sin US fue el que presentó menor valor.

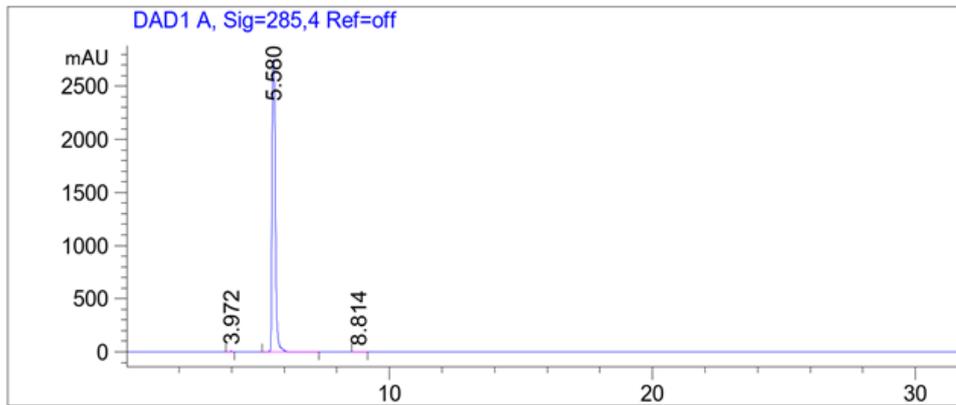
A partir de estos resultados obtenidos, se puede concluir que el tratamiento mediante ultrasonido en ambos tipos de solvente no resultó ser lo suficientemente eficaz como para lograr extraer una mayor cantidad de compuestos polifenólicos con actividad antioxidante, lo cual demuestra que no necesariamente un mejor rendimiento de extracción significa una mayor cantidad de compuestos polifenólicos bioactivos (apartado 4.2). A su vez estos resultados concuerdan, como se mencionó anteriormente, con los obtenidos por Žlabur et al., 2016, en el cual concluyen que el tratamiento con ultrasonido a una frecuencia de 35 kHz y 140 W durante 30 minutos máximo en agua a temperatura ambiente, no resultó eficaz a la hora de extraer más cantidad de compuestos fenólicos u obtener mayores valores de actividad antioxidante para las hojas de menta y toronjil. Si bien la actividad antioxidante frente a radicales ABTS<sup>•+</sup> en todos los casos menos para el extracto de menta etanólico, fue mayor (o sin diferencias significativas) para los extractos sin US comparados con los que sí fueron sometidos al proceso, para la actividad antioxidante frente a radicales peroxilo no ocurrió lo mismo. En este caso para los extractos acuosos de menta y boldo sí se observó la misma tendencia, sin embargo para el extracto acuoso de carqueja y todos los extractos etanólicos se vio una tendencia a aumentar la actividad hasta las dos horas de aplicación del US.

Se decidió trabajar con los extractos acuosos y etanólicos sin US de todas las hierbas; dado que a nivel de compuestos polifenólicos y actividad antioxidante frente a radicales ABTS<sup>•+</sup> se vio una clara tendencia en la que presentan mayor contenido y actividad, respectivamente. En el caso del boldo y la menta acuosos, esta tendencia también se observa para la actividad antioxidante frente a radicales peroxilo. A su vez, de esta forma se mantiene una homogeneización en el método de obtención de las muestras, pudiendo comparar una a una los diferentes extractos en los ensayos que siguen.

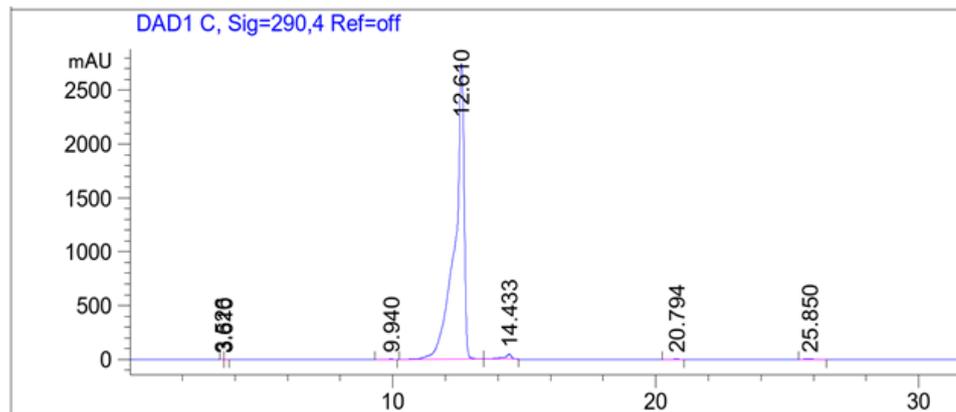
#### **4.5 Identificación y cuantificación de compuestos fenólicos**

Como siguiente paso, se llevó a cabo la identificación y cuantificación de compuestos fenólicos mediante HPLC-DAD para todos los extractos. Los cromatogramas obtenidos para los patrones utilizados se presentan en la figura 4.5.1.

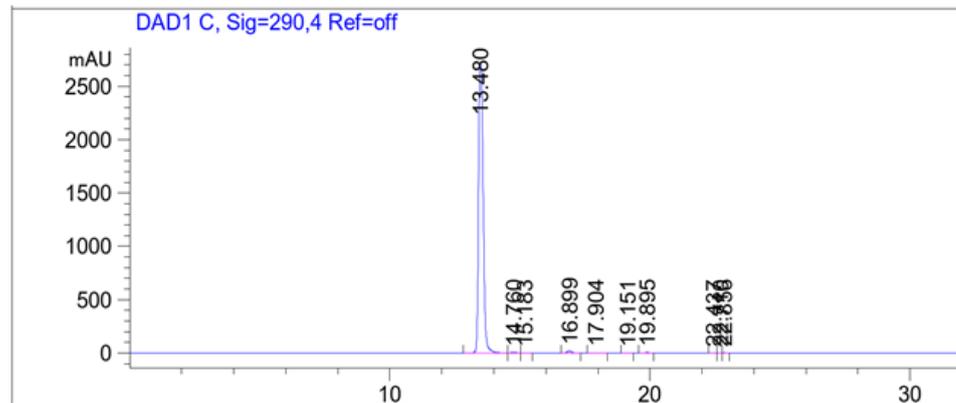
### Ácido gálico



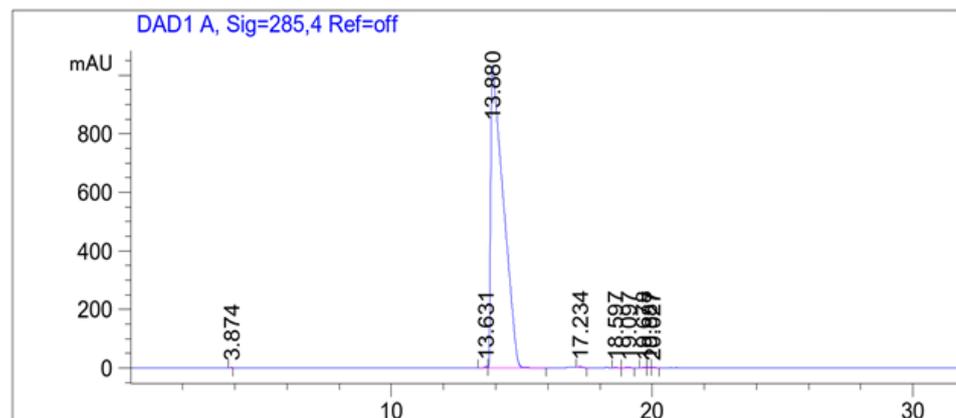
### Ácido cafeico

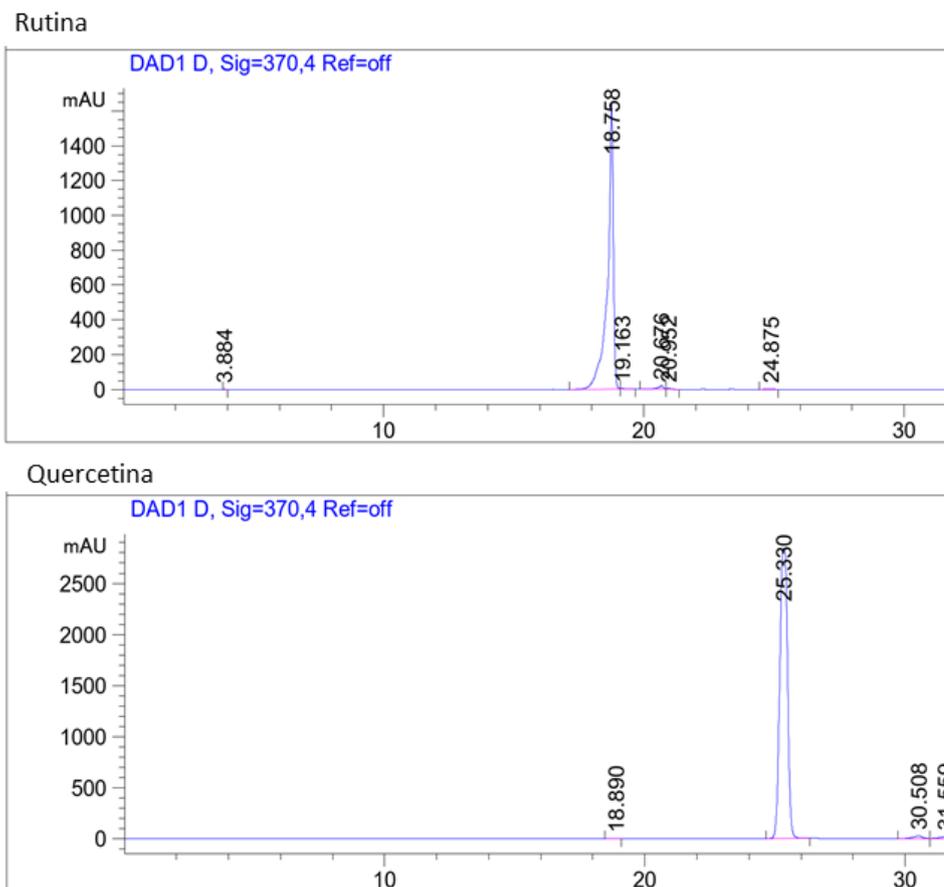


### Ácido clorogénico



### Boldina

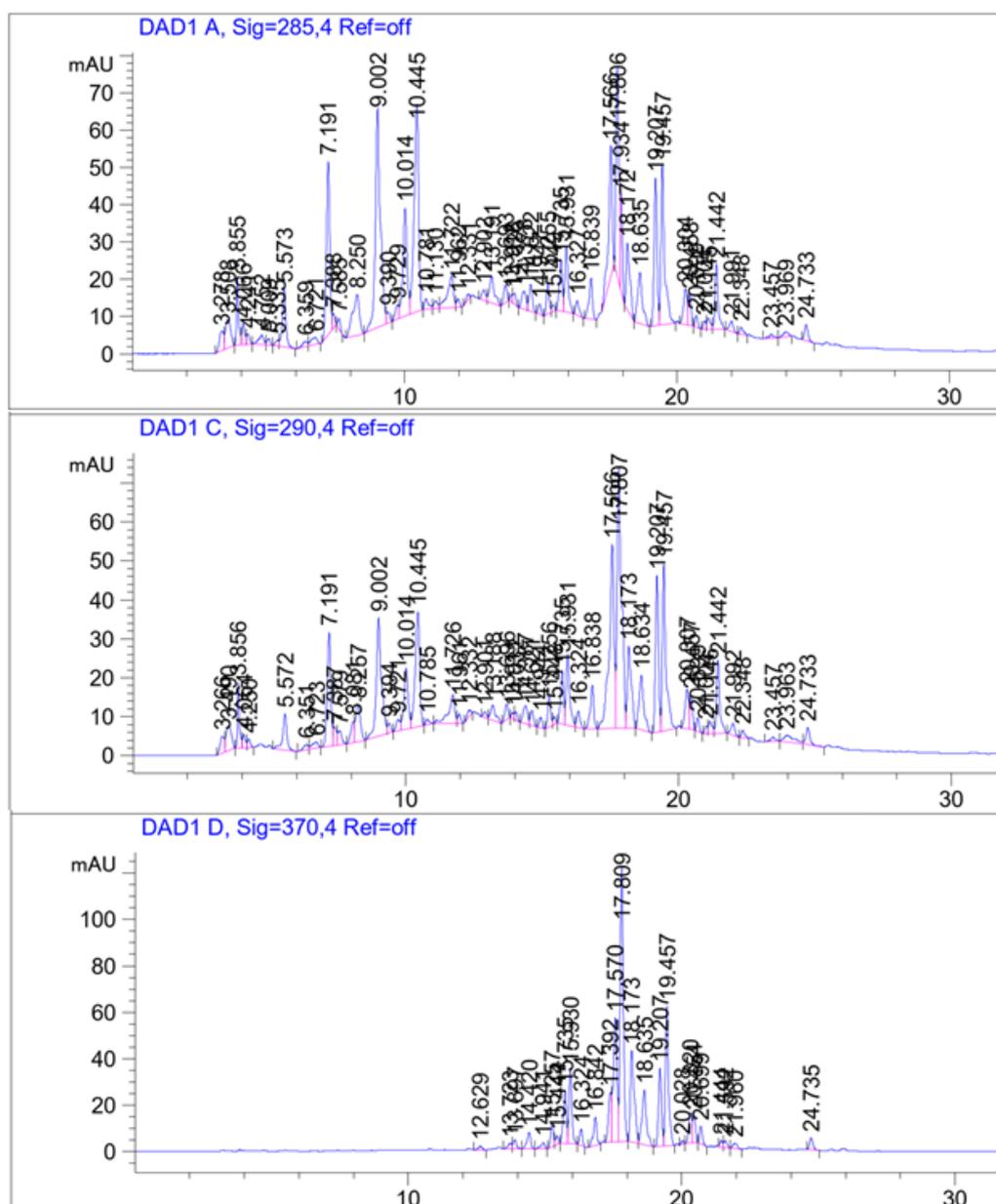




**Figura 4.5.1:** Cromatogramas obtenidos para los patrones utilizados.

En la figura 4.5.2 se presentan a modo de ejemplo, los cromatogramas obtenidos para el extracto de boldo acuoso a una concentración de 5 mg/mL a las tres longitudes de onda medidas.

Boldo acuoso 5 mg/mL



**Figura 4.5.2:** Cromatogramas obtenidos para la muestra de boldo acuoso a una concentración de 5 mg/mL, se presentan las tres longitudes de onda medidas: 285, 290 y 370 nm.

En la tabla 4.5.1 se presentan los resultados obtenidos para las concentraciones (expresadas en  $\mu\text{g/mL}$  de extracto) de los diferentes compuestos patrón.

**Tabla 4.5.1:** Valores de concentración expresados en  $\mu\text{g/mL}$  de extracto para todos los extractos.

	Agua destilada			EtOH 95%		
	Menta	Boldo	Carqueja	Menta	Boldo	Carqueja
<b>Ácido cafeico</b>	$2,9 \pm 0,3$	$0,65 \pm 0,01$	$0,35 \pm 0,02$	$0,9 \pm 0,3$	$0,63 \pm 0,07$	$1,2 \pm 0,2$
<b>Boldina</b>	ND	$10,5 \pm 0,2$	ND	ND	$9,5 \pm 0,2$	ND
<b>Rutina</b>	$87,8 \pm 0,6$	$22,0 \pm 0,7$	$6,1 \pm 0,4$	$11,9 \pm 0,2$	$10,5 \pm 0,4$	$7,2 \pm 0,2$
<b>Quercetina</b>	ND	ND	$7,0 \pm 0,6$	ND	ND	$101 \pm 3$

Nota: resultados expresados como promedio  $\pm$  desviación estándar (n=3), ND= no detectado.

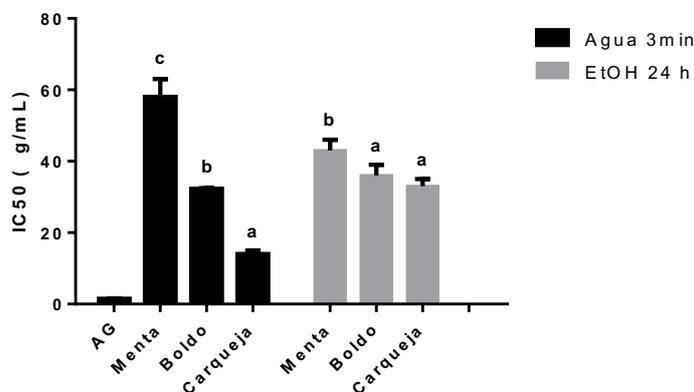
El ácido gálico y el clorogénico no lograron ser detectados en ningún caso, por lo tanto no fueron incluidos en la misma. Asimismo, la quercetina parece estar ausente en la menta y el boldo para ambos tipos de extractos. Según la bibliografía, el boldo presenta una cantidad considerable de compuestos modificados de quercetina, especialmente glicosilados (Falé et al., 2012; Simirgiotis & Schmeda-Hirschmann, 2010; Soto et al., 2014) por lo que por esta razón no se logró detectar este compuesto sin modificaciones, únicamente la rutina (quercetin-3-rutinósido). En el caso de la menta, estudios como los realizados por Boualem et al., 2017; Kapp et al., 2013; Mahdavia et al., 2017; Pereira et al., 2016 tampoco señalan la presencia de la quercetina no modificada como componente presente en esa hierba. La boldina es un compuesto que se logró detectar únicamente en los extractos de boldo, lo cual concuerda con la literatura consultada (Correia Teixeira et al., 2016; Falé et al., 2012b; Simirgiotis & Schmeda-Hirschmann, 2010).

Con respecto al ácido gálico, uno de los compuestos antes mencionados como no detectados, el estudio realizado por Ferreira Zielinski et al., 2014 señala que ese compuesto tampoco pudo ser detectado en ninguna de las tres hierbas en cuestión, concordando con los resultados obtenidos en este trabajo. Sin embargo, este mismo estudio logró detectar la presencia del ácido clorogénico tanto en el boldo como en la menta, lo que puede sugerir una mejora al método aquí empleado, dado que en su trabajo emplearon una columna C18 de menor tamaño de partícula ( $3,5\mu\text{m}$ ), lo que puede ser una ventaja para lograr una mejor separación de los componentes. A su vez, diferentes estudios (Mahdavia et al., 2017; Menezes et al., 2016) afirman la presencia de ambos compuestos en cuestión en la menta y la carqueja, por lo que la no detección obtenida aquí puede deberse también a que el gradiente de fase móvil no permite una separación tan precisa como los utilizados en otros estudios.

Los compuestos que se encontraron en mayor cantidad en todos los casos fueron la rutina y la boldina. Además, la quercetina en el extracto etanólico de carqueja también resultó entre los compuestos más abundantes.

## 4.6 Determinación de la actividad antiglicante

Para la determinación de los valores de IC<sub>50</sub> se realizó el ensayo a diferentes concentraciones, abarcando porcentajes de inhibición desde aproximadamente el 30% hasta el 100%, los resultados se presentan en la figura 4.6.1.



**Figura 4.6.1:** Valores de IC<sub>50</sub> obtenidos para los extractos. La aminoguanidina (AG) fue el inhibidor utilizado como referencia. Los valores se expresan como promedio  $\pm$  desviación estándar, n= 10. Las letras señalan los valores significativamente diferentes de IC<sub>50</sub> entre las hierbas del mismo tipo de solvente.

Todos los extractos presentan actividad antiglicante, previniendo así la formación de AGEs fluorescentes. Sin embargo, el valor de IC<sub>50</sub> obtenido para la aminoguanidina (el inhibidor de referencia), resultó ser bastante menor comparado con el obtenido para las hierbas. Esto indica que los extractos estudiados presentan una menor actividad antiglicante que la presentada por el inhibidor de referencia. Sin embargo, los resultados continúan siendo muy alentadores, dado que Ramkissoon et al., 2013 realizaron extracciones 1:10 con etanol 50% durante una semana y los mayores valores de actividad antiglicante que obtuvieron fue para el tomillo, el perejil, las hojas de curry, la cúrcuma, la menta y el cilantro, con valores de IC<sub>50</sub> entre 12 y 13 mg/mL. En el presente estudio, los extractos etanólicos de las tres hierbas estudiadas inhiben al 50% la reacción de glicación a concentraciones bastante menores en comparación, entre 43 y 33  $\mu$ g/mL. Asimismo, en el trabajo realizado por Rodrigues Franco et al., 2018, los extractos 1:5 en etanol 98% que presentaron una actividad antiglicante del 100% fueron las hierbas *B. forficata*, *C. sinensis* y *S. cumini* a una concentración de 5 mg/mL, mientras que las estudiadas en este trabajo logran inhibir la reacción de glicación al 100% a concentraciones menores (1mg/mL).

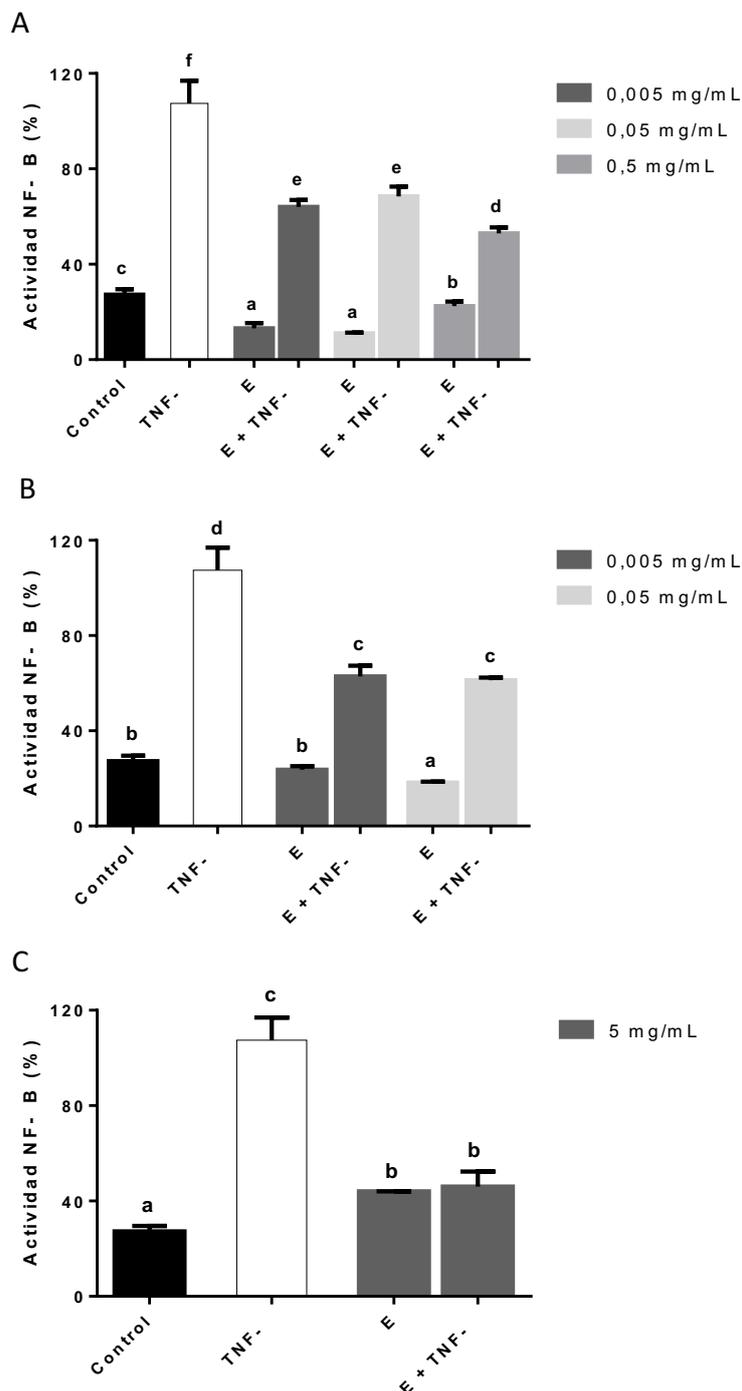
Puntualmente, el extracto de menta acuoso es el que presenta una menor actividad antiglicante, seguido por su extracto etanólico. El boldo y la carqueja acuosos son los que mayor actividad antiglicante presentan, siendo el de carqueja el que presenta un menor valor de IC<sub>50</sub>. Se puede ver una clara tendencia en ambos tipos de extractos

para todas las hierbas, siendo la carqueja el que presenta mayor actividad y la menta la menor. Con respecto a los extractos acuosos, la tendencia observada es diferente a la presente en los resultados del contenido polifenólico total (tabla 4.3.1) y actividad antioxidante mediante ABTS y ORAC (tablas 4.4.1.1 y 4.4.2.1, respectivamente), siendo la carqueja el extracto con menor contenido de polifenoles y actividad antioxidante la que presentó una mayor actividad antiglicante. Esto parecería indicar que la actividad antiglicante de los extractos acuosos no está exclusivamente ligada a los compuestos polifenólicos y a su vez, sugiere ser independiente de la actividad antioxidante que presentan. Los extractos etanólicos muestran la misma tendencia que los acuosos si bien es menos pronunciada (no hay diferencias significativas entre el boldo y la carqueja), coincidiendo con la tendencia obtenida para la actividad antioxidante de los extractos frente a radicales peroxilo. En la investigación realizada por Chinchansure et al., 2015 se señala que hay una relación entre la actividad antioxidante y la antiglicante referido a los compuestos polifenólicos, pero depende del modelo de actividad antiglicante utilizado. Según ese mismo estudio, se ha encontrado que la quercetina es un compuesto con gran actividad antiglicante, así como la rutina, llegando esta última a causar hasta un 83% de inhibición de la actividad antiglicante a una concentración de 3mM. A su vez, Gugliucci et al., 2009 señala que el ácido cafeico inhibe más del 95% de la generación de AGEs a una concentración muy baja (0,5mM), lo que sugiere que la actividad antiglicante de los extractos estudiados podría explicarse por la presencia de estos compuestos, aunque hay que tener en cuenta la presencia de otros compuestos que tengan efecto sinérgico.

Si se toma como referencia los extractos acuosos, la concentración utilizada fue de 4 gramos de muestra seca en 200 mL de agua a hirviendo durante 3 minutos, el proceso es el mismo que al preparar una taza de té. Por cada 200 mL de infusión de hierba se obtiene aproximadamente 1 gramo de extracto (tabla 4.4.1), lo que equivale a una concentración de compuestos bioactivos de 5 mg/mL. A nivel del tracto gastrointestinal llegaría aproximadamente la mitad de la concentración de dichos compuestos (Akhlaghi & Foshati, 2017), lo cual equivale a una gran actividad antiglicante.

#### **4.7 Ensayo *in vitro* de actividad anti-inflamatoria**

Para realizar este estudio se seleccionaron los extractos en agua hirviendo durante 3 minutos dado que son las muestras que presentaron mejores características bioactivas. En la figura 4.7.1 se presentan los valores obtenidos de actividad anti-inflamatoria expresados en porcentaje de actividad de NF-κB (inflamación) para cada hierba, las concentraciones de extracto que no presentaron inhibición no fueron incluidas en los gráficos.



**Figura 4.7.1:** Porcentajes de actividad de NF-κB obtenidos para los extractos acuosos de menta (A), boldo (B) y carqueja (C). Control: células incubadas únicamente con medio de cultivo suplementado (sin TNF-α ni extracto de hierba), TNF-α: células incubadas con TNF-α, E (Extracto): células incubadas solo con el extracto de hierba, E + TNF-α: células incubadas con el extracto de hierba y TNF-α. Los valores se expresan como promedio ± desviación estándar, n= 3. Las letras indican diferencias significativas de los valores entre sí.

El extracto acuoso de carqueja parece ser el que menor actividad anti-inflamatoria presenta, dado que fue el extracto más concentrado (5 mg/mL) el que logró presentar dicho efecto. Con respecto a las otras dos hierbas, el extracto acuoso de menta

presentó actividad anti-inflamatoria desde la concentración de 0,5 a 0,005 mg/mL, mientras que el extracto a 5 mg/mL resultó tan concentrado que no provocó una disminución en la inflamación, por lo que ese resultado no fue incluido en la figura 4.7.1. El extracto de boldo presentó actividad en las dos concentraciones menores (0,05 y 0,005 mg/mL), no presentando actividad a partir de la concentración de 0,5 mg/mL, esto parece indicar que se necesita menos concentración de dicho extracto para lograr una reducción de la actividad de NF- $\kappa$ B en un 40% aproximadamente.

Los extractos que presentaron mayor reducción de la inflamación fueron el de menta 0,5 mg/mL y el de carqueja 5 mg/mL, reduciendo los porcentajes de inflamación a valores de  $53 \pm 3 \%$  y un  $46 \pm 6 \%$  respectivamente. Según el trabajo realizado por (Meijer et al., 2015) obtuvieron valores bastante bajos de actividad anti-inflamatoria, ya que las plantas de brócoli picadas solo redujeron un  $16,4 \pm 0,2\%$  de porcentaje de reducción de la actividad de NF- $\kappa$ B, mientras que la lechuga mantecosa no ocasionó diferencias significativas en la reducción de actividad. Si comparamos esos resultados con los porcentajes de reducción de la actividad de NF- $\kappa$ B obtenidos en este estudio se puede afirmar que estos últimos son considerablemente mayores y por lo tanto estas hierbas presentan una mayor actividad anti-inflamatoria.

Se tomó como referencia la señal obtenida por las células incubadas solas (sin TNF- $\alpha$  ni extracto de hierba), y se obtuvo un valor base de  $27 \pm 2 \%$  de actividad NF- $\kappa$ B. Con respecto a los controles de células incubadas con extracto de hierba, puede verse que en el caso del boldo y la menta estos valores son menores al obtenido incubando las células solas, esto parece indicar que la presencia de los extractos ejercen de por si cierto efecto anti-inflamatorio sobre las células que no han sido estimuladas con agentes pro-inflamatorios.

Se puede concluir que todas las hierbas presentaron actividad anti-inflamatoria a diferentes concentraciones, siendo el boldo la que presentó actividad a menores valores de concentración.

## 4.8 Estudios de bioaccesibilidad

Para realizar los estudios de bioaccesibilidad se realizó un estudio de simulación gastrointestinal.

### 4.8.1 Determinación del contenido de polifenoles totales luego de la simulación digestiva

En la tabla 4.8.1.1 se presentan los valores de concentración de polifenoles totales expresados en mg GAE/g muestra seca para los extractos etanólicos y acuosos digeridos.

**Tabla 4.8.1.1:** Valores de concentración de polifenoles totales obtenidos para los extractos acuosos y etanólicos digeridos y sin digerir, expresados en mg ácido gálico/g muestra. Las letras indican las diferencias significativas entre los extractos digeridos y sin digerir de la misma hierba en cada solvente.

	Agua destilada			EtOH 95%		
	Menta	Boldo	Carqueja	Menta	Boldo	Carqueja
<b>Digeridos</b>	58 ± 6 a	58 ± 2 a	20,9 ± 0,7 a	13,6 ± 0,5 a	56 ± 2 a	20,2 ± 0,2 a
<b>Sin digerir</b>	86 ± 8 b	88 ± 8 b	52 ± 5 b	20 ± 2 b	61 ± 6 a	53 ± 5 b

Nota: resultados expresados como promedio ± desviación estándar (n=10).

El contenido de compuestos fenólicos totales de los extractos sometidos al proceso de simulación gastrointestinal son menores a los que presentan los extractos que no fueron sometidos a dicho proceso, presentando diferencias significativas con los originales. Esta disminución en concentración de compuestos polifenólicos significa conjugación y/o pérdida de los mismos, se ha constatado que los compuestos fenólicos presentan una baja biodisponibilidad y una rápida excreción urinaria y biliar (Akhlaghi & Foshati, 2017). El extracto de boldo etanólico fue el único que no presentó diferencias significativas luego de atravesar el proceso de simulación digestiva.

La relación entre las hierbas se mantiene para los extractos digeridos. En el caso de las muestras acuosas, el extracto de carqueja es en ambos casos el que menor cantidad de polifenoles totales presenta, los extractos de boldo y menta se ven disminuidos en igual cantidad. Con los extractos etanólicos sucede lo mismo, manteniéndose la misma relación entre las diferentes hierbas. Se puede observar una mayor disminución de cantidad de compuestos polifenólicos en la carqueja, mientras que en la menta la reducción es en menor proporción. En el boldo esta disminución no es significativa; esto puede deberse al tipo de compuesto fenólico presente en cada hierba y qué tanto se ven alterados por el proceso de simulación digestiva. A pesar de que los extractos acuosos presentaron valores menores de actividad antioxidante luego de haber sido sometidos al proceso de simulación digestiva, éstos siguen siendo mayores a los obtenidos en la literatura para los extractos sin digerir, los cuales fueron de 34,3 ± 2,1, 14,1 ± 0,6 y 40,7 mg GAE/g muestra seca para el boldo, la carqueja y la menta respectivamente (Mahdavia et al., 2017; Sabir et al., 2017; Soto et al., 2014).

Con respecto a los valores obtenidos para los extractos etanólicos sometidos al proceso de simulación digestiva, en el caso de la menta dicho valor si bien es menor, es muy similar al encontrado por Ramkisson et al., 2013 (14,51 ± 0,08 mg GAE/g muestra) para extractos etanólicos de menta sin haber sido sometidos al proceso de digestión. La carqueja resultó ser menor al presente para extracto sin digerir en la literatura (40,3 mg GAE/g muestra, Anderson Assaid et al., 2013) sin embargo para el extracto de boldo ocurrió lo contrario, comparando con el valor determinado por Soto et al., 2014 (50 mg GAE/g muestra). Esto significa que si bien la actividad disminuyó,

sigue siendo considerable e incluso comparable con la obtenida para extractos sin digerir en otros estudios.

#### 4.8.2 Determinación de la actividad antioxidante luego de la simulación digestiva

##### 4.8.2.1 Frente a radicales ABTS<sup>•+</sup>

Con respecto a la actividad antioxidante de los compuestos una vez digeridos, puede verse una relación con la cantidad de compuestos polifenólicos. Al disminuir la cantidad de estos compuestos disminuye la actividad antioxidante tanto frente a radicales ABTS<sup>•+</sup> como frente a radicales peroxilo. En la tabla 4.8.2.1.1, se presentan los resultados obtenidos para la actividad antioxidante frente a radicales ABTS<sup>•+</sup>.

**Tabla 4.8.2.1.1:** Resultados obtenidos de actividad antioxidante frente a radicales ABTS<sup>•+</sup> para los extractos acuosos y etanólicos digeridos y sin digerir, expresados en  $\mu$ moles Trolox/ g muestra. Las letras indican las diferencias significativas entre los extractos digeridos y sin digerir de la misma hierba en cada solvente.

	Agua destilada			EtOH 95%		
	Menta	Boldo	Carqueja	Menta	Boldo	Carqueja
<b>Digeridos</b>	43 $\pm$ 1 a	44 $\pm$ 4 a	22 $\pm$ 2 a	13,12 $\pm$ 0,04 a	40,5 $\pm$ 0,7 a	15,4 $\pm$ 0,4 a
<b>Sin digerir</b>	75 $\pm$ 5 b	73 $\pm$ 6 b	69 $\pm$ 4 b	31 $\pm$ 2 b	65,3 $\pm$ 0,8 b	49 $\pm$ 2 b

Nota: resultados expresados como promedio  $\pm$  desviación estándar (n=10).

Los valores obtenidos de actividad antioxidante frente a radicales ABTS<sup>•+</sup> en todos los casos disminuyó al haberse sometido al proceso de simulación gastrointestinal. Puede apreciarse, además, que esta disminución es muy similar en todos los casos, manteniendo la misma relación entre las hierbas tanto en los extractos etanólicos como acuosos. Si bien los valores de actividad disminuyeron, comparando con valores de actividad antioxidante de extractos de hierbas sin digerir en trabajos encontrados en la literatura, se puede concluir que estos valores se encuentran dentro del rango de actividad presentada en esos casos. Por ejemplo, el trabajo citado anteriormente de Gramza-Michałowska et al., 2008, obtuvieron valores de actividad entre 58,05 y 27,97  $\mu$ moles TE/g muestra (romero y tomillo, respectivamente). Si tomamos en cuenta ese estudio, los valores de actividad de los extractos digeridos acuosos de menta y boldo, así como el etanólico de boldo entrarían en ese rango hallado para extractos sin digerir. Asimismo, el estudio realizado por Conde-Hernández & Guerrero-Beltrán, 2014 con hojas de hierba santa y pápalo, arrojó que diferentes tipos de extractos hidroalcohólicos de estas hierbas presentaron actividad antioxidante frente a radicales ABTS<sup>•+</sup> entre 0,03 y 0,08  $\mu$ moles Trolox/ g muestra seca para la primera, y 0,06 y 0,17  $\mu$ moles Trolox/ g muestra seca para la segunda. Estos resultados son

considerablemente menores a los obtenidos luego de haber sometido a los extractos aquí estudiados al proceso de simulación digestiva, lo que sugiere que los mismos presentan una considerable actividad antioxidante frente a radicales ABTS<sup>•+</sup> incluso luego de haber sufrido dicho proceso.

#### 4.8.2.2 Frente a radicales peroxilo

En la tabla 4.8.2.2.1 se presentan los resultados obtenidos para la actividad antioxidante frente a radicales peroxilo, para todos los extractos antes y después de haber sido sometidos al proceso de simulación gastrointestinal.

**Tabla 4.8.2.2.1:** Resultados obtenidos de actividad antioxidante frente a radicales peroxilo para los extractos acuosos y etanólicos digeridos y sin digerir, expresados en  $\mu$ moles Trolox/ g muestra. Las letras indican las diferencias significativas entre los extractos digeridos y sin digerir de la misma hierba en cada solvente.

	Agua destilada			EtOH 95%		
	Menta	Boldo	Carqueja	Menta	Boldo	Carqueja
<b>Digeridos</b>	73 $\pm$ 2 a	71 $\pm$ 2 a	45 $\pm$ 4 a	19 $\pm$ 2 a	10,9 $\pm$ 0,7 a	32 $\pm$ 3 a
<b>Sin digerir</b>	116 $\pm$ 1 b	115 $\pm$ 9 b	64 $\pm$ 6 b	11,2 $\pm$ 0,9 b	53 $\pm$ 3 b	100 $\pm$ 3 b

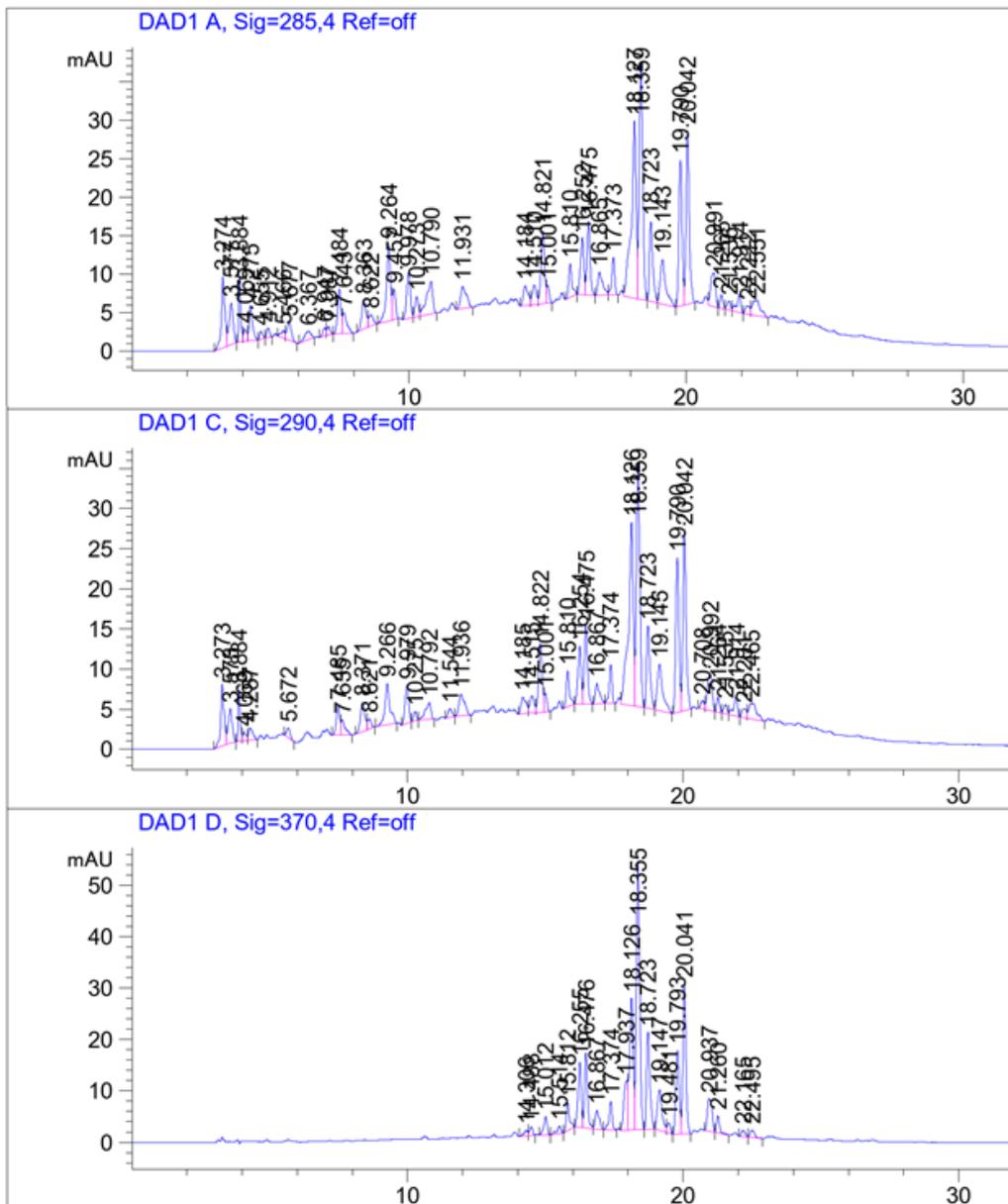
Nota: resultados expresados como promedio  $\pm$  desviación estándar (n=8).

Puede verse que de la misma forma que ocurre con la concentración de polifenoles totales y actividad antioxidante frente a radicales ABTS<sup>•+</sup>, luego de haber sido sometidos al proceso de simulación gastrointestinal los extractos pierden actividad antioxidante frente a radicales peroxilo. En el caso de los extractos acuosos puede verse que en todos los casos la actividad antioxidante se redujo significativamente. Con respecto a los extractos etanólicos, puede observarse que en el caso de la menta, el valor de actividad antioxidante aumentó luego de haber sido digerido, esto puede deberse a que los compuestos fenólicos pudieron haber sufrido cambios o haber dado lugar a otros compuestos diferentes que presentan una mayor actividad antioxidante. Con respecto al boldo y la carqueja etanólicos, ambos valores de actividad se vieron considerablemente reducidos luego de haber sido sometidos al proceso de simulación gastrointestinal. Los valores de actividad obtenidos para los extractos digeridos en todos los casos siguen siendo similares a los que obtuvieron Zheng & Wang, 2001, trabajo previamente citado. Esto sugiere una muy fuerte actividad antioxidante frente a radicales peroxilo por parte de los compuestos que componen los extractos, que si bien disminuye al ser sometidos al proceso de simulación gastrointestinal, sigue siendo considerable en comparación a extractos sin digerir de otras hierbas.

### 4.8.1 Identificación y cuantificación de compuestos fenólicos luego de la simulación digestiva

En la figura 4.8.1.1 se presentan a modo de ejemplo los cromatogramas obtenidos para el extracto de boldo acuoso a una concentración de 5 mg/mL luego de haber sido sometido al proceso de simulación gastrointestinal, a las diferentes longitudes de onda medidas.

Boldo acuoso digerido 5 mg/mL



**Figura 4.8.1.1:** Cromatogramas obtenidos para el extracto de boldo acuoso a una concentración de 5 mg/mL luego de haber sido sometido al proceso de simulación gastrointestinal, se presentan las tres longitudes de onda medidas: 285, 290 y 370 nm.

En la tabla 4.8.1.1 se presentan los valores obtenidos para los compuestos que pudieron ser identificados y cuantificados mediante HPLC.

**Tabla 4.8.1.1:** Valores de concentración expresados en  $\mu\text{g/mL}$  de extracto para todos los extractos luego de haber sido sometidos al proceso de simulación gastrointestinal.

	Agua destilada			EtOH 95%		
	Menta	Boldo	Carqueja	Menta	Boldo	Carqueja
<b>Ácido cafeico</b>	$0,90 \pm 0,03$	ND	$0,19 \pm 0,02$	$1,61 \pm 0,07$	ND	$0,57 \pm 0,02$
<b>Boldina</b>	ND	$8,4 \pm 0,3$	ND	ND	$8,5 \pm 0,3$	ND
<b>Rutina</b>	$40,4 \pm 0,7$	$7,0 \pm 0,4$	$3,5 \pm 0,2$	$10,7 \pm 0,7$	$6,9 \pm 0,8$	$17,80 \pm 0,09$

Nota: resultados expresados como promedio  $\pm$  desviación estándar (n=3), ND= no detectado.

Los compuestos que pudieron cuantificarse mediante el método empleado fueron el ácido cafeico, la boldina y la rutina. La boldina logra atravesar el tracto gastrointestinal para ser detectada en los extractos digeridos, disminuyendo muy poco su concentración (tabla 4.5.1). El compuesto que anteriormente se había hallado para los extractos de carqueja sin digerir (tabla 4.5.1) fue la quercetina, que para los mismos extractos luego de haber sido sometidos al proceso de simulación gastrointestinal no se encontró. Esto puede deberse a modificaciones (como por ejemplo conjugaciones) sufridas por este compuesto, las cuales son muy frecuentes durante el proceso de digestión (Manach et al., 2005). En el caso de la menta etanólica, la cantidad de ácido cafeico detectada luego de someter el extracto al proceso de simulación gastrointestinal es mayor a la obtenida para el extracto de partida (tabla 4.5.1), esto puede deberse a la hidrólisis de compuestos como los flavonoides capaces de generar ácidos fenólicos durante dicho proceso (Chen et al., 2018). El único compuesto hallado en todos los extractos fue la rutina, exhibiendo en el caso de los extractos acuosos aproximadamente la mitad de la concentración obtenida para los extractos sin digerir (tabla 4.5.1). Esta disminución en concentración de aproximadamente de la mitad puede explicarse gracias al estudio realizado por Sawai et al., 1987, donde demostraron que la excreción urinaria de rutina en pacientes a los que se les suministró 75 mg de la misma fue del 50%. Sin embargo, en el caso de los extractos etanólicos, el de menta no presenta diferencias significativas con el valor obtenido para el extracto sin digerir, mientras que el extracto de carqueja presentó un valor mayor de concentración para el extracto sometido al proceso, pudiéndose haberse originado gracias a la conjugación de la quercetina.

#### 4.8.2 Determinación de la actividad antiglicante luego de la simulación digestiva

La actividad antiglicante también se vio disminuida luego de haber sometido a los extractos a simulación digestiva. En la tabla 4.8.3.1 pueden verse los valores de IC50

expresados en  $\mu\text{g}/\text{mL}$  para todos los extractos antes y luego del proceso de simulación digestiva.

**Tabla 4.8.3.1:** Valores de IC50 de los extractos expresados en  $\mu\text{g}/\text{mL}$ . Las letras indican las diferencias significativas entre los extractos digeridos y sin digerir de la misma hierba en cada solvente.

	Agua destilada			EtOH 95%		
	Menta	Boldo	Carqueja	Menta	Boldo	Carqueja
<b>Digeridos</b>	$70 \pm 5$ b	$96 \pm 4$ b	$98 \pm 3$ b	$53 \pm 5$ b	$51 \pm 4$ b	$55 \pm 5$ b
<b>Sin digerir</b>	$58 \pm 5$ a	$32,3 \pm 0,2$ a	$14 \pm 1$ a	$43 \pm 3$ a	$36 \pm 3$ a	$33 \pm 2$ a

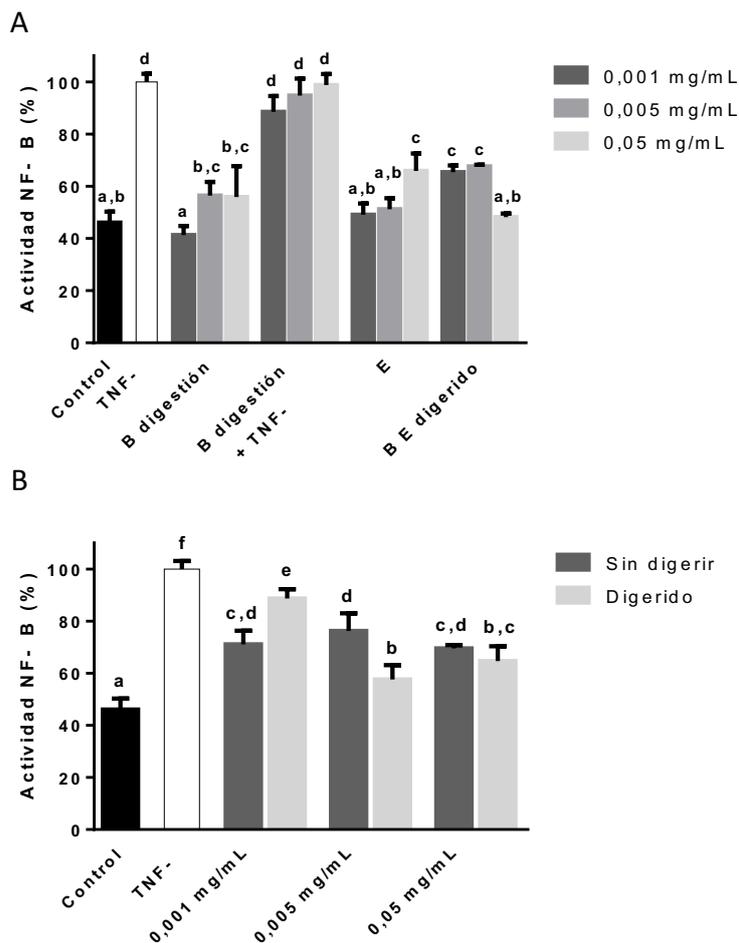
Nota: resultados expresados como promedio  $\pm$  desviación estándar (n=12).

Los valores obtenidos para la actividad antiglicante de los extractos se vio notoriamente afectada por el proceso de simulación digestiva, especialmente para los extractos acuosos de boldo y carqueja. El máximo valor de IC50 obtenido fue de  $98 \pm 3$   $\mu\text{g}/\text{mL}$  (extracto de carqueja acuoso). Este valor es bastante mayor al que este mismo extracto presentó antes de ser sometido al proceso de simulación digestiva, sin embargo, el valor obtenido luego de haber sido digerido sigue siendo un valor bastante bajo si tomamos en cuenta el estudio realizado por Ramkissoon et al., 2013, se obtuvo un valor de IC50 de aproximadamente 12 mg/mL en extractos acuosos que no fueron sometidos al proceso de simulación gastrointestinal. A su vez, si se toma en cuenta la concentración de extracto que se consume al ingerir una taza de té (aprox. 5 mg/mL), la cantidad de éste que se encuentre bioaccesible será muy superior a la necesaria para ocasionar el 50% de inhibición de la reacción de glicación (aprox. 2,5 mg/mL según Akhlaghi & Foshati, 2017). Con respecto al extracto de menta acuoso y todos los extractos etanólicos la disminución en concentración, si bien fue significativa, no resultó tan drástica como para los extractos acuosos de boldo y carqueja acuosos. En el caso de los extractos etanólicos, según Rodrigues Franco et al., 2018 los IC50 que obtuvieron fueron en el entorno de los 2,5 mg/mL, mientras que en este estudio los extractos etanólicos sometidos a dicho proceso presentaron valores de IC50 menores a 1 mg/mL.

#### 4.8.3 Ensayo *in vitro* de actividad anti-inflamatoria luego de la simulación digestiva

Se decidió continuar el estudio con el extracto acuoso de boldo, dado que fue el que logró presentar mejor actividad anti-inflamatoria en el ensayo del apartado 4.7, de forma de analizar las consecuencias del proceso de simulación digestiva sobre la actividad anti-inflamatoria de los extractos. Se utilizaron las concentraciones en las que ya se obtuvo actividad considerable (0,05 y 0,005 mg/mL) y además se agregó una

concentración menor de 0,001 mg/mL. En la figura 4.8.4.1 se presentan los resultados obtenidos.



**Figura 4.8.4.1:** Porcentajes de actividad de NF-κB obtenidos para los extractos acuosos de boldo antes y después del proceso de simulación digestiva. El gráfico A corresponde a los porcentajes de actividad NF-κB de los controles realizados, siendo B digestión (blanco de digestión) las sales y demás componentes que participan del proceso de simulación gastrointestinal, B digestión + TNF-α refiere al blanco de las sales de digestión en presencia de TNF-α, E (Extracto): células incubadas solo con el extracto de hierba y B E digerido (blanco de extracto digerido) corresponde al extracto sometido al proceso de simulación gastrointestinal incubado sin TNF-α. El gráfico B corresponde a la actividad anti-inflamatoria presentada por los extractos que no fueron sometidos al proceso de simulación gastrointestinal comparado con los que sí fueron sometidos. TNF-α: refiere a las células incubadas únicamente con TNF-α, Control: refiere a las células incubadas únicamente con medio de cultivo suplementado (sin TNF-α ni extracto de hierba). Los valores se expresan como promedio ± desviación estándar, n= 9. Las letras indican diferencias significativas entre los valores.

Las sales y demás componentes que se utilizaron para realizar la simulación gastrointestinal (B digestión) parecen no generar efecto pro-inflamatorio (figura 4.8.4.1, A), dado que no se encuentran diferencias significativas con el valor base

obtenido para las células incubadas sin agente pro-inflamatorio ni extracto de hierba (Control). Sin embargo, B digestión en presencia de TNF- $\alpha$  (B digestión + TNF- $\alpha$ ) sí genera una gran activación de NF- $\kappa$ B, lo que permite confirmar que dichas sales y demás componentes tampoco presentan actividad anti-inflamatoria, por lo que de observarse una disminución en la actividad NF- $\kappa$ B para los extractos sometidos al proceso de simulación gastrointestinal, sería exclusiva del extracto estudiado.

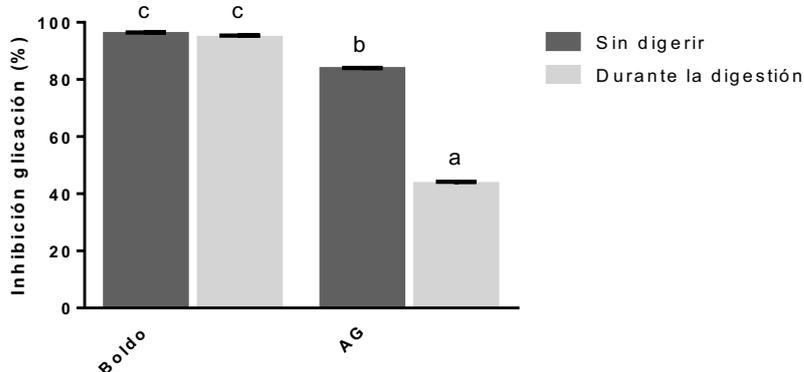
Los extractos de boldo que no fueron sometidos al proceso de simulación digestiva (figura 4.8.4.1, B) presentaron una disminución en la actividad NF- $\kappa$ B, lo que significa que disminuyeron la inflamación ocasionada por el agente pro-inflamatorio TNF- $\alpha$ . Los valores obtenidos de disminución de la actividad de la cascada pro-inflamatoria fueron entre 24 a 30%. El resultado de actividad NF- $\kappa$ B no varió al aumentar la concentración, pues no se observaron diferencias significativas entre los valores obtenidos. Los extractos sometidos al proceso de simulación digestiva (figura 4.8.4.1, B) también lograron disminuir la actividad NF- $\kappa$ B. El extracto de menor concentración estudiada (0,001 mg/mL) fue el que presentó una mayor actividad NF- $\kappa$ B, con un valor de reducción de solo 11%. Sin embargo las otras dos concentraciones estudiadas presentaron valores de actividad menores, siendo la reducción de actividad pro-inflamatoria obtenida de 35 a 42%. Estos resultados sugieren que si bien los extractos de boldo lograron disminuir la actividad NF- $\kappa$ B a las concentraciones estudiadas, los extractos de boldo sometidos al proceso de simulación digestiva presentaron valores de actividad NF- $\kappa$ B aún menores, lo que indica un mejor efecto anti-inflamatorio luego de haber sido consumidos y una vez en el intestino.

Como conclusión parcial de esta parte, los extractos presentan una disminución significativa en contenido de polifenoles totales, actividad antioxidante tanto frente a radicales ABTS<sup>•+</sup> como peroxilo y actividad antiglicante una vez sometidos al proceso de simulación gástrica. Sin embargo, si se toma en cuenta nuevamente que al consumir una taza de té se está ingiriendo aproximadamente un cuarto de extracto (tabla 4.4.1) lo que equivale a una concentración de aproximadamente 5 mg/mL de extracto, estas características bioactivas estarían presentes a nivel intestinal luego de haber sido ingerida la infusión. Asimismo, comparando los valores obtenidos de los extractos sometidos al proceso de simulación digestiva para cada propiedad bioactiva con los que se encuentran en la literatura para extractos similares sin haber pasado por dicho proceso, se puede concluir que presentan actividad suficiente como para ser considerados fuentes de compuestos bioactivos naturales para aplicar, en este caso, en la industria alimentaria.

#### **4.9 Capacidad inhibitoria de la glicación con fructosa a nivel del tracto gastrointestinal**

Con los extractos acuosos de boldo, dado que son los que hasta ahora presentaron mejores características bioactivas, se procedió a medir la actividad antiglicante

durante el proceso de simulación digestiva según (Bains & Gugliucci, 2017); siguiendo las etapas descritas anteriormente, pero en este caso se trabajó con la reacción de glicación entre la proteína BSA y la fructosa como modelo. Los resultados obtenidos se presentan en la figura 4.9.1.



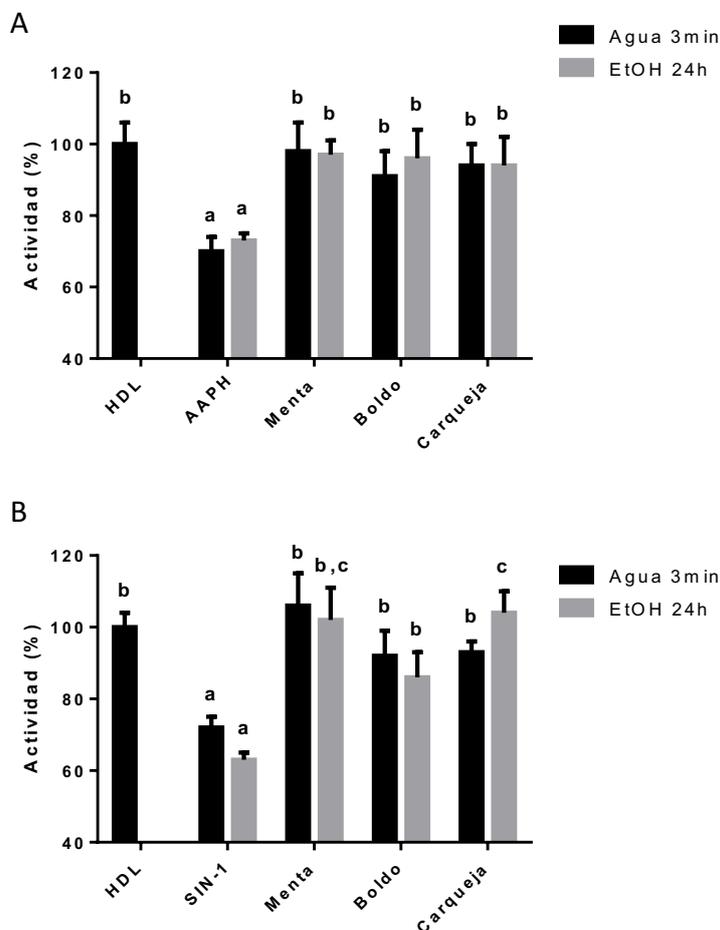
**Figura 4.9.1:** Valores de porcentaje de actividad antiglicante obtenidos para los sistemas incubados con boldo 5 mg/mL o aminoguanidina 4mM (AG) durante el proceso de simulación gastrointestinal, comparado con los que no fueron sometidos a dicho proceso. Las letras señalan los valores significativamente diferentes de porcentaje de actividad entre el sistema sometido o no al proceso de simulación gastrointestinal.

El boldo a una concentración de 5 mg/mL logra una actividad antiglicante del  $95,4 \pm 0,3\%$  y ésta parece mantenerse durante el proceso de simulación gastrointestinal, no encontrándose diferencias significativas entre ambos valores. Con la aminoguanidina ocurrió algo diferente, a una concentración de 4mM logró un porcentaje de actividad antiglicante del  $77 \pm 1\%$ , lo cual de por sí es menor al obtenido con el boldo, esto indica que se utilizó una concentración más baja de la necesaria para lograr el 100% de inhibición. A su vez, durante el proceso de simulación gastrointestinal este valor disminuyó considerablemente, alcanzando un porcentaje de actividad antiglicante de tan solo  $43,4 \pm 0,8\%$ . Esto puede significar que el inhibidor de la actividad antiglicante utilizado como referencia presenta menos resistencia frente al proceso de simulación gastrointestinal, debe destacarse que en el extracto de boldo hay una amplia variedad de compuestos de diferente naturaleza, por lo que es razonable pensar que algunos resistan más o menos el proceso de digestión. También debe tenerse en cuenta que la concentración de boldo utilizada pudo haber sido lo suficientemente elevada como para que no se presenten diferencias significativas antes y durante el proceso.

Este resultado sugiere que tanto el extracto acuoso de boldo presenta una gran actividad antiglicante durante el proceso de simulación gastrointestinal, lo que significa una disminución en la formación endógena de compuestos AGEs.

#### 4.10 Ensayos de oxidación de la HDL

Se realizaron ensayos frente a ambos agentes oxidantes con los extractos de agua destilada y etanol 95% sin ultrasonido de las tres hierbas, de forma de confirmar su eficacia en el mantenimiento de la actividad de la enzima PON-1. Se utilizó una concentración de extracto de 0,05 mg/mL, los datos se presentan en la figura 4.10.1.



**Figura 4.10.1:** Porcentajes de actividad de la PON-1 presente en la HDL cuando ésta fue incubada por 3h a 37°C con los extractos (concentración de 0,05 mg/mL) y AAPH (A) o SIN-1 (B). Las letras indican los valores significativamente diferentes.

Todos los extractos presentaron una excelente capacidad de mantenimiento de la actividad arilesterasa de la PON-1, llegando incluso a valores mayores al 100%, lo que indica no solo un mantenimiento, sino una mejora de dicha actividad. En la presencia de AAPH (figura 4.10.1, A), los extractos acuosos presentaron un valor máximo de mantenimiento del 98%, mientras que los etanólicos un valor del 97%, los cuales son valores muy elevados de mantenimiento de actividad. La hierba que mayor porcentaje de actividad logró mantener en presencia de AAPH fue la menta tanto acuosa como etanólica, sin embargo no se presentan diferencias significativas con los extractos de

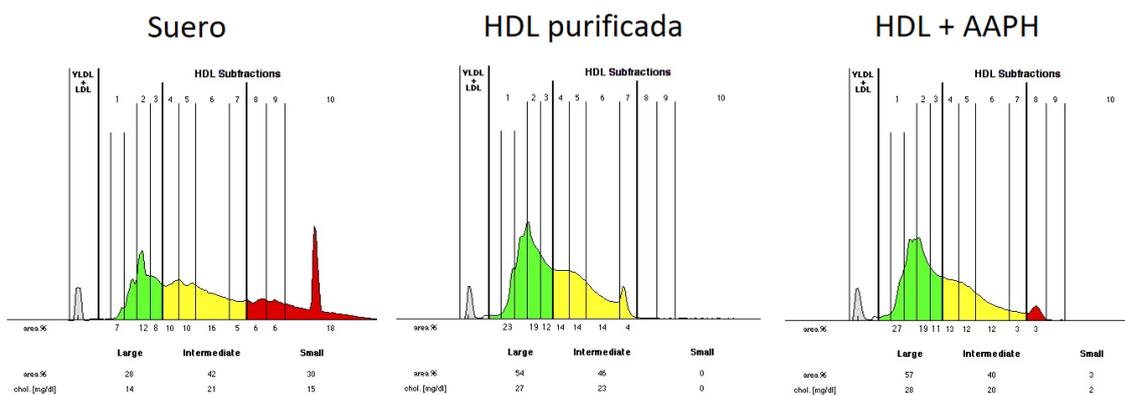
las otras hierbas, por lo que todos los extractos de todas las hierbas presentaron similar efecto. Los resultados fueron similares frente a SIN-1 (figura 4.10.1, B), donde 106% fue el valor máximo obtenido de mantenimiento para los extractos acuosos y 104% el mayor valor para los extractos etanólicos. En estos casos parecería indicar que se llegó incluso a mejorar la actividad original de la PON-1, un 6% en el caso de los extractos acuosos y un 4% en el caso de los extractos etanólicos. Frente a SIN-1, el extracto acuoso que mayor mantenimiento de la actividad presentó fue el de menta, mientras que el que menor mantenimiento de actividad presentó fue el de carqueja. El extracto etanólico que mejor mantenimiento de actividad presentó fue el de carqueja, mientras que los que menor mantenimiento presentaron fueron los de menta y boldo, dado que no presentaron diferencias significativas entre ellos. En el trabajo realizado por Menini et al., 2007 con extractos acuosos de yerba mate, obtuvieron un 100% de la mantención de la actividad de la PON-1 con una concentración de extracto de 0,02 mg/mL.

Como ya se conoce, el SIN-1 es un agente oxidante que libera peroxinitrito en condiciones aerobias. Estos resultados sugieren que la capacidad antioxidante de los extractos de menta (y el de carqueja etanólico) son más eficaces evitando el daño realizado por este tipo de radical. A su vez, esta aparente actividad protectora presente en el extracto etanólico de la menta parece ser independiente de sus actividades antioxidante y antiglicante, dado que este extracto fue el que menor actividad antioxidante presentó y su actividad antiglicante también fue baja.

Se puede concluir que estos extractos efectivamente presentan una actividad inhibitoria de la oxidación de la PON-1, aumentando su interés médico como futuros ingredientes en alimentos funcionales.

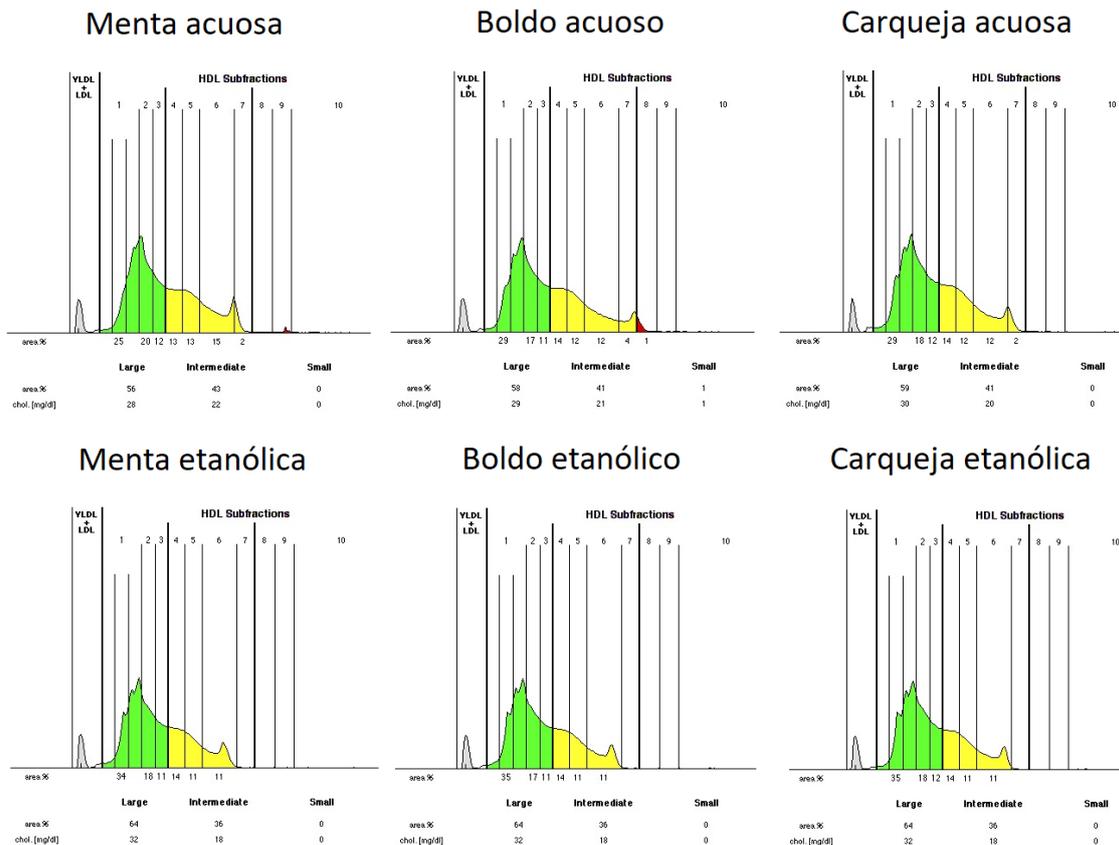
#### **4.10.1 Acercamiento al análisis estructural de la población de partículas de HDL**

Finalmente, se realizó un ensayo en gel de electroforesis en condiciones nativas, de forma de poder explorar qué es lo que ocurre con estas partículas de HDL en presencia de agentes oxidantes y si esta situación se revierte en presencia de los extractos de las hierbas. Para ello se realizaron dos ensayos de Lipoprint, uno incubando con AAPH (concentración final de extracto de 0,01 mg/mL) como agente oxidante. En la figura 4.10.2.1 se muestran los resultados que se obtuvieron una vez analizados los geles para las muestras sometidas a la acción del AAPH.



**Figura 4.10.2.1:** Perfiles de tamaños de partículas obtenidos para la población de HDL de los tres controles realizados. Se representa la concentración de partículas en el eje vertical en función del tamaño de partícula en el eje horizontal. El color verde simboliza las partículas de mayor tamaño, el amarillo las de tamaño medio y el rojo las de menor tamaño. El primer perfil corresponde al suero sin tratamiento alguno, el segundo corresponde a la HDL purificada. El tercer perfil corresponde a la HDL incubada con AAPH durante 3h a 37°C en presencia de los extractos tanto acuosos como etanólicos.

Si bien aún no está del todo resuelto cuáles son las partículas de HDL que más protegen contra la formación de la placa de ateroma, se ha visto que las de mayor tamaño pueden tener más relevancia en este rol (Bergmeier et al., 2004; Brown et al., 2010). Según este antecedente, parecería que las hierbas están cumpliendo una función muy interesante sobre las partículas de HDL cuando éstas fueron enfrentadas a AAPH. Claramente puede observarse en la figura 4.10.2.1, que el perfil original de la HDL purificada prácticamente no cuenta con partículas de poco tamaño, una vez sometidas al AAPH, estas partículas sufren una redistribución, generándose nuevas partículas de menor tamaño. En la figura 4.10.2.1 se presentan los resultados obtenidos para las muestras en presencia de los extractos.



**Figura 4.10.2.2:** Perfiles de tamaños de partículas obtenidos para la población de la HDL purificada en presencia de los extractos y AAPH. Los primeros tres perfiles corresponden a los extractos acuosos y los últimos tres a los etanólicos. El color verde simboliza las partículas de mayor tamaño, el amarillo las de tamaño medio y el rojo las de menor tamaño.

Cuando se le agregan los extractos (ya sean acuosos o etanólicos) puede verse una clara reestructuración hacia el perfil original de HDL (figura 4.10.2.2). Esto significa que los extractos de estas tres hierbas, sean acuosos o etanólicos, tienen la capacidad de restaurar la población de HDL a su distribución original. Si asociamos estos resultados a la actividad registrada por la PON-1, ésta fue mayor en la HDL purificada, menor en presencia de oxidantes y preservada una vez enfrentada a los extractos, esto sugiere que tal vez las partículas de HDL de mayor tamaño podrían estar más involucradas en esta actividad (Bergmeier et al., 2004).

## 5 Conclusiones

Los resultados presentados en esta investigación demostraron que todos los extractos estudiados presentaron considerable cantidad de compuestos polifenólicos totales, así como una gran actividad antioxidante (frente a radicales ABTS<sup>•+</sup> o peroxilo), antiglicante y anti-inflamatoria, incluso luego de haber sido sometidos al proceso de simulación gastrointestinal. Asimismo, se evidenció que los extractos de todas las hierbas parecen presentar actividad anti-aterogénica, dado que logran evitar la oxidación de la enzima PON-1 manteniendo su actividad en presencia de agentes oxidantes, así como afectar la distribución de subclases de la HDL, llevando a condiciones con mayor actividad anti-aterogénica.

1. Identificar, cuantificar y caracterizar los principales compuestos bioactivos presentes en extractos obtenidos mediante diferentes métodos de extracción (convencionales y asistidos por ultrasonido), comparar las características bioactivas de cada uno y seleccionar los más efectivos.

Los resultados obtenidos para la cantidad de compuestos polifenólicos totales reflejan una gran cantidad de los mismos. Los valores de contenido de compuestos polifenólicos hallados para todos los extractos fueron incluso mayores a los encontrados en la literatura. Los compuestos que lograron ser identificados y cuantificados mediante HPLC fueron el ácido cafeico, la boldina, la rutina y la quercetina. Esta última sólo se encontró en los extractos de carqueja, así como la boldina que se encontró únicamente en los extractos de boldo, el resto de los compuestos se encontraron en los extractos de todas las hierbas.

La aplicación de ultrasonido como método para lograr una mejor extracción de compuestos polifenólicos y así lograr extractos con mejores características bioactivas no logró ser eficaz. Los extractos con aplicación de ultrasonido presentaron menor contenido de compuestos polifenólicos que los que no presentaron US, lo mismo sucedió con la actividad antioxidante frente a radicales ABTS<sup>•+</sup> obteniéndose igual (con excepción del extracto de menta etanólico), sino menor actividad a los extractos obtenidos sin aplicar US. La única excepción fue la de la actividad antioxidante frente a radicales peroxilo, donde el extracto acuoso de carqueja así como todos los extractos etanólicos sí presentaron una mayor actividad al aplicársele el tratamiento con US hasta 2 horas, disminuyendo esta actividad a mayores tiempos de aplicación. De forma de poder comparar uno a uno los extractos en los siguientes ensayos y contar con un método uniforme para obtener los extractos se decidió continuar con los extractos sin aplicación de US.

2. Evaluar las actividades antioxidante, antiglicante y anti-inflamatoria de los extractos seleccionados antes y luego de haber sido sometidos al proceso de simulación gastrointestinal.

La actividad antioxidante mediante ambos métodos encontrada en todos los extractos fue considerable, resultando igual o mejor a la reportada para las mismas y otras hierbas estudiadas en diferentes estudios.

Las actividades antiglicante y anti-inflamatoria que presentan los extractos estudiados en este trabajo son incluso mayores a las referencias encontradas, reflejando la gran capacidad bioactiva de las hierbas estudiadas.

Luego del proceso de simulación gastrointestinal, solo se lograron identificar y cuantificar el ácido cafeico, la boldina y la rutina. El primero se encontró en los extractos de menta y carqueja, la boldina se encontró en los extractos de boldo, mientras que la rutina se halló en los extractos de todas las hierbas. Si bien los valores de compuestos polifenólicos totales y actividad antioxidante obtenidos luego de haber sido sometidos a dicho proceso fueron menores a los obtenidos antes del mismo, éstos siguen siendo lo suficientemente elevados como para considerar que pueden llegar a causar efectos puntuales en el organismo, comparando con valores extraídos de la literatura.

La actividad antiglicante disminuyó luego de que los extractos fueran sometidos al proceso de simulación gastrointestinal, sin embargo los resultados hallados indican que estos extractos son más efectivos que los encontrados en la literatura. Referido a la actividad anti-inflamatoria, los resultados obtenidos para los extractos sometidos al proceso de simulación gastrointestinal resultaron presentar incluso una mayor actividad que los extractos sin haber sido sometidos a dicho proceso. Para poder afirmar esto último, sin embargo, se necesitaría realizar variados análisis a nivel *in vivo*, analizando a nivel de orina y suero las concentraciones de estos compuestos. Asimismo, más a largo plazo podría analizarse el efecto directo de estos compuestos utilizando modelos animales.

3. Evaluar el poder antiglicante del extracto seleccionado frente AGEs originados por la fructosa a nivel del tracto gastrointestinal.

Se comprobó que el extracto de boldo acuoso logró inhibir considerablemente la formación de AGEs mediante la unión de fructosa a nivel del tracto gastrointestinal, no presentando diferencias significativas con respecto al extracto sin haber sido sometido a dicho proceso. El resultado de inhibición de la reacción de glicación por fructosa a nivel del tracto gastrointestinal para el extracto de boldo resultó incluso ser mayor al presentado por la aminoguanidina, inhibidor de referencia.

4. Evaluar la hipótesis de que los extractos obtenidos de las hierbas logran evitar la oxidación de la proteína PON-1 del complejo HDL, así como también evitar posibles cambios conformacionales en dicho complejo.

Se puede concluir que estos extractos (acuosos y etanólicos) parecen presentar características anti-aterómicas, logrando prevenir la oxidación de la enzima PON-1 y manteniendo su actividad, en presencia de agentes oxidantes (AAPH y SIN-1). Asimismo, parecen afectar la distribución de subclases de la HDL, llevando a condiciones con mayor actividad anti-aterogénica frente a AAPH como agente oxidante.

Como conclusión general, los extractos acuosos y etanólicos de las tres hierbas estudiadas (*Mentha x piperita L.*, *Peumus boldus Mol.* y *Baccharis trimera Less.*), son muy buenos candidatos como fuente de compuestos polifenólicos con capacidades bioactivas muy interesantes como para ser utilizados como ingredientes en alimentos funcionales.

## 6 Bibliografía

- Abad, M. J., & Bermejo, P. (2006). Baccharis (Compositae): a review update. *Arkivoc*, 2007(7), 76–96. <https://doi.org/10.3998/ark.5550190.0008.709>
- Abate, G., Delbarba, A., Marziano, M., Memo, M., & Uberti, D. (2015). Advanced Glycation End Products (Ages) in Food: Focusing on Mediterranean Pasta. *Journal of Nutrition & Food Sciences*, 5(6), 1–8. <https://doi.org/10.4172/2155-9600.1000440>
- Abelson, P., & Kennedy, D. (2004). The obesity epidemic. *Science*, 304(5676), 1413. <https://doi.org/10.1126/science.304.5676.1413>
- Ago, T., Kuroda, J., Kamouchi, M., Sadoshima, J., & Kitazono, T. (2011). Pathophysiological Roles of NADPH Oxidase/Nox Family Proteins in the Vascular System. *Circulation Journal*, 75(8), 1791–1800. <https://doi.org/10.1253/circj.CJ-11-0388>
- Akhlaghi, M., & Foshati, S. (2017). Bioavailability and metabolism of flavonoids. *International Journal of Nutrition Sciences*, 2(4), 180–184. <https://doi.org/10.1159/000237784>
- Anderson Assaid, S., Lage, F. F., Chagas, P. M. B., Fraguas, R. M., Freire, J. M., Marques, T. R., & Corrêa, A. D. (2013). *Antioxidants from Medicinal Plants Used in the Treatment of Obesity*. 3(3), 429–443.
- AOAC. (1990). AOAC Official Methods of Analysis. *Association of Official Agricultural Chemists. Washington, D.C., 15th*(Volume 1), 136–138.
- Ariza, M. T., Reboredo-Rodríguez, P., Cervantes, L., Soria, C., Martínez-Ferri, E., González-Barreiro, C., ... Simal-Gándara, J. (2018). Bioaccessibility and potential bioavailability of phenolic compounds from achenes as a new target for strawberry breeding programs. *Food Chemistry*, 248(June 2017), 155–165. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2017.11.105>
- Arrillaga de Maffei, B. R. (1969). *Plantas medicinales* (D. Aljanati, H. D. E. Marsillo, & R. V Talice, Eds.). Montevideo: Nuestra tierra.
- Asztalos, B. F. (2010). High Density Lipoprotein Particles. In E. J. Schaefer (Ed.), *High Density Lipoproteins, Dyslipidemia, and Coronary Heart Disease* (pp. 25–32). <https://doi.org/10.1007/978-1-4419-1059-2>
- Atamas, S. P., Chapoval, S. P., & Keegan, A. D. (2013). Cytokines in chronic respiratory diseases. *F1000 Biology Reports*, 5(February), 1–12. <https://doi.org/10.3410/B5-3>
- Bains, Y., & Gugliucci, A. (2017). Ilex paraguariensis and its main component chlorogenic acid inhibit fructose formation of advanced glycation endproducts with amino acids at conditions compatible with those in the digestive system. *Fitoterapia*, 117, 6–10. <https://doi.org/10.1016/j.fitote.2016.12.006>
- Baldán, Á., & De Aguiar Vallim, T. Q. (2016). miRNAs and High-Density Lipoprotein metabolism. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1861(12), 2053–2061. <https://doi.org/10.1016/j.bbali.2016.01.021>
- Barg Venturini, R., & Queirós Armand Ugón, F. (2007). *Agricultura agroecológica – orgánica en el Uruguay. Principales conceptos, situación actual y desafíos*. (M. I. Cárcamo & R. Carrere, Eds.). Montevideo: RAP-AL Uruguay.
- Bengmark, S., & Gil Hernández, A. (2007). Productos finales de la glicación y de la lipoxidación como amplificadores de la inflamación: Papel de los alimentos. *Nutricion Hospitalaria*, 22(6), 625–640.

- Bergmeier, C., Siekmeier, R., & Gross, W. (2004). Distribution spectrum of paraoxonase activity in HDL fractions. *Clinical Chemistry*, 50(12), 2309–2315. <https://doi.org/10.1373/clinchem.2004.034439>
- Bierhaus, A., & Nawroth, P. P. (2009). Multiple levels of regulation determine the role of the receptor for AGE (RAGE) as common soil in inflammation, immune responses and diabetes mellitus and its complications. *Diabetologia*, 52(11), 2251–2263. <https://doi.org/10.1007/s00125-009-1458-9>
- Blanche, P. J., Gong, E. L., Forte, T. M., & Nichols, A. V. (1981). Characterization of human high-density lipoproteins by gradient gel electrophoresis. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Lipids and Lipid Metabolism*, 665(3), 408–419. [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/0005-2760\(81\)90253-8](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/0005-2760(81)90253-8)
- Bloom, D. E., Cafiero, E., Jané-Llopis, E., Abrahams-Gessel, S., Reddy Bloom, L., Fathima, S., ... Weiss, J. (2011). The Global Economic Burden of Noncommunicable Diseases. *World Economic Forum*, (September), 1–46. <https://doi.org/10.1192/bjp.184.5.393>
- Bondy, S. C. (2016). Metal Toxicity, Inflammation and Oxidative Stress. In S. C. Bondy & A. Campbell (Eds.), *Inflammation, Aging, and Oxidative Stress* (pp. 3–16). <https://doi.org/10.1007/978-3-319-33486-8>
- Bot, I., De Jager, S. C. A., Zerneck, A., Lindstedt, K. A., Van Berkel, T. J. C., Weber, C., & Biessen, E. A. L. (2007). Perivascular mast cells promote atherogenesis and induce plaque destabilization in apolipoprotein E-deficient mice. *Circulation*, 115(19), 2516–2525. <https://doi.org/10.1161/CIRCULATIONAHA.106.660472>
- Boualem, M., Mokhtar, M., Saiah, F., Benourad, F., & Bouhadiba, R. (2017). *Identification of Mentha piperita L . and Ricinus communis L . polyphenols by HPLC - DAD - ESI - MS and evaluation of their insecticidal properties against Aphis spiraeicola P.* 7(1), 28–34.
- Bremer Boaventura, B. C., da Silva, E. L., Liu, R. H., Prudêncio, E. S., Di Pietro, P. F., Becker, A. M., & Amboni, R. D. de M. C. (2015). Effect of yerba mate (Ilex paraguariensis A. St. Hil.) infusion obtained by freeze concentration technology on antioxidant status of healthy individuals. *LWT - Food Science and Technology*, 62(2), 948–954. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2015.02.028>
- Brien, K. D. O., Allen, M. D., McDonald, T., Chait, A., Harlan, J. M., Fishbein, D., ... Alpers, C. E. (1993). Vascular Cell Adhesion Molecule-1 Is Expressed in Human Coronary Atherosclerotic Plaques Implications for the Mode of Progression of Advanced Coronary Atherosclerosis Adsorption assay Riboprobe preparation. *Journal of Clinical Investigation*, 92(August), 945–951.
- Brown, W. V., Brewer, H. B., Rader, D. J., & Schaefer, E. J. (2010). HDL as a treatment target†. *Journal of Clinical Lipidology*, 4(1), 5–16. <https://doi.org/10.1016/j.jacl.2009.12.005>
- Brownlee, A. M., Vlassara, H., Kooney, A., Ulrich, P., & Cerami, A. (2011). *Diabetes-Induced Arterial Aminoguanidine Prevents Cross-linking.* 232(4758), 1629–1632.
- Brownlee, M., Vlassara, H., Kooney, A., Ulrich, P., & Cerami, A. (1986). Aminoguanidine prevents Diabetes-induced arterial wall protein cross-linking. *Science*, 232(4758), 1629–1632. <https://doi.org/10.1126/science.3487117>
- Bucciarelli, L. G., Wendt, T., Qu, W., Lu, Y., Lalla, E., Rong, L. L., ... Schmidt, A. M. (2002). RAGE blockade stabilizes established atherosclerosis in diabetic apolipoprotein E-null mice. *Circulation*, 106(22), 2827–2835.

- <https://doi.org/10.1161/01.CIR.0000039325.03698.36>
- Cai, Y., Sun, M., & Corke, H. (2003). Antioxidant Activity of Betalains from Plants of the Amaranthaceae. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51(8), 2288–2294. <https://doi.org/10.1021/jf030045u>
- Campbell, J. (2017). Prostaglandins. *Salem Press Encyclopedia of Science*. Retrieved from <http://proxy.timbo.org.uy:443/login?url=http://search.ebscohost.com/login.aspx?direct=true&db=ers&AN=87324501&lang=es&site=eds-live>
- Campbell, N. A., & Reece, J. B. (2007). *Biología*. Retrieved from <https://books.google.com.uy/books?id=QcU0yde9PtkC>
- Camps, J., & García-Heredia, A. (2014). Introduction: Oxidation and Inflammation, A Molecular Link Between Non communicable Diseases. In J. Camps (Ed.), *Oxidative Stress and Inflammation in Non- communicable Diseases – Molecular Mechanisms and Perspectives in Therapeutics* (Volume 824, pp. 1–4). <https://doi.org/10.1007/978-3-319-07320-0>
- Cannon PhD, B. D. (2013). Digestion. *Salem Press Encyclopedia of Science*. Retrieved from <http://proxy.timbo.org.uy:443/login?url=http://search.ebscohost.com/login.aspx?direct=true&db=ers&AN=87690326&lang=es&site=eds-live>
- Celep, E., Akyüz, S., İnan, Y., & Yesilada, E. (2018). Assessment of potential bioavailability of major phenolic compounds in *Lavandula stoechas* L. ssp. *stoechas*. *Industrial Crops and Products*, 118(March), 111–117. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2018.03.041>
- Celep, E., Charehsaz, M., Akyüz, S., Acar, E. T., & Yesilada, E. (2015). Effect of in vitro gastrointestinal digestion on the bioavailability of phenolic components and the antioxidant potentials of some Turkish fruit wines. *Food Research International*, 78, 209–215. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2015.10.009>
- Cerdá, C., Sánchez, C., Climent, B., Vázquez, A., Iradi, A., El Amrani, F., ... Sáez, G. T. (2014). Oxidative Stress and DNA Damage in Obesity-Related Tumorigenesis. In J. Camps (Ed.), *Oxidative Stress and Inflammation in Non-communicable Diseases – Molecular Mechanisms and Perspectives in Therapeutics* (Volume 824, pp. 5–17). <https://doi.org/10.1007/978-3-319-07320-0>
- Chen, X., Xiong, J., He, L., Zhang, Y., Li, X., Zhang, L., & Wang, F. (2018). Effects of In Vitro Digestion on the Content and Biological Activity of Polyphenols from *Acacia mearnsii* Bark. *Molecules (Basel, Switzerland)*, 23(7). <https://doi.org/10.3390/molecules23071804>
- Chinchansure, A. A., Korwar, A. M., Kulkarni, M. J., & Joshi, S. P. (2015). Recent development of plant products with anti-glycation activity: A review. *RSC Advances*, 5(39), 31113–31138. <https://doi.org/10.1039/c4ra14211j>
- Chourasia, D., & Sethi, S. (2017). Chemical Biology of Oxidative Stress and Its Role in the Pathophysiology of Neuropsychiatric Disorders. In P. K. Maurya & P. Chandra (Eds.), *Oxidative Stress: Diagnostic Methods and Applications in Medical Science* (pp. 1–22). <https://doi.org/10.1007/978-981-10-4711-4>
- Clennin, M. N., Payne, J. P. W., Rienzi, E. G., Lavie, C. J., Blair, S. N., Pate, R. R., & Sui, X. (2015). Association between Cardiorespiratory Fitness and Health-Related Quality of Life among Patients at Risk for Cardiovascular Disease in Uruguay. *Plos One*, 10(4), e0123989. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0123989>

- Colpo, A. C., Rosa, H., Lima, M. E., Pazzini, C. E. F., De Camargo, V. B., Bassante, F. E. M., ... Folmer, V. (2016). Yerba mate (*Ilex paraguariensis* St. Hill.)-based beverages: How successive extraction influences the extract composition and its capacity to chelate iron and scavenge free radicals. *Food Chemistry*, *209*, 185–195. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2016.04.059>
- Conde-Hernández, L. A., & Guerrero-Beltrán, J. Á. (2014). Total phenolics and antioxidant activity of piper auritum and porophyllum ruderale. *Food Chemistry*, *142*, 455–460. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2013.07.078>
- Corbett, J. A., Tilton, R. G., Chang, K., Hasan, K. S., Ido, Y., Wang, J. L., ... McDaniel, M. L. (1992). Aminoguanidine, a novel inhibitor of nitric oxide formation, prevents diabetic vascular dysfunction. *Diabetes*, *41*(4), 552–556. <https://doi.org/10.2337/diab.41.4.552>
- Correia Teixeira, C. C., de Freitas Cabral, T. P., de Sousa, J. P. B., de Pádua Teixeira, S., Bastos, J. K., & Pedro de Freitas, L. A. (2016). Study of Quality Assurance For Peumus Boldus M Products By Botanic Profiling, Extraction Optimization, HPLC Quantification and Antioxidant Assay. *Pharmacognosy Journal*, *8*(3), 264–272. <https://doi.org/10.5530/pj.2016.3.16>
- Cosme Pérez, I. (2008). El uso de las plantas medicinales. *Revista Intercultural*, 23–26.
- Cruz Hernández, J., Licea Puig, M. E., Hernández García, P., Marcel, E. A. A., & Yanes Quesada, M. (2011). Aldosa reductasa y proteína quinasa C en las complicaciones crónicas de la diabetes mellitus. *Revista Latinoamericana de Patología Clínica y Medicina de Laboratorio*, *58*(2), 102–107. Retrieved from <http://www.medigraphic.com/cgi-bin/new/resumen.cgi?IDARTICULO=29439>
- D'Archivio, M., Filesi, C., Di Benedetto, R., Gargiulo, R., Giovannini, C., & Masella, R. (2007). Polyphenols, dietary sources and bioavailability. *Annali Dell'Istituto Superiore Di Sanita*, *43*(4), 348–361. [https://doi.org/Vol. 43, no. 4: 348-361](https://doi.org/Vol.43.no.4:348-361)
- D'Archivio, M., Filesi, C., Vari, R., Scazzocchio, B., & Masella, R. (2010). Bioavailability of the polyphenols: Status and controversies. *International Journal of Molecular Sciences*, *11*(4), 1321–1342. <https://doi.org/10.3390/ijms11041321>
- DAMJANOVIC-VRATNICA, B., SUKOVIC, D., & PEROVIC, S. (2016). Essential Oil Components and Antimicrobial Activity of Peppermint (*Mentha Piperita*) From Montenegro. *The Journal "Agriculture and Forestry,"* *62*(1), 259–268. <https://doi.org/10.17707/AgricultForest.62.1.29>
- Dantoine, T. F., Debord, J., Charmes, J. P., Merle, L., Marquet, P., Lachatre, G., & Leroux-Robert, C. (1998). Decrease of serum paraoxonase activity in chronic renal failure. *Journal of the American Society of Nephrology : JASN*, *9*(11), 2082–2088. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9808094>
- Dávalos, A., Bartolomé, B., Suberviola, J., & Gómez-Cordovés, C. (2003). Orac-Fluorescein As a Model for Evaluating Antioxidant Activity of Wines. *POLISH JOURNAL OF FOOD AND NUTRITION SCIENCES Pol. J. Food Nutr. Sci*, *1253*(1), 133–136.
- Davidson, W. S., Silva, R. A. G. D., Chantepie, S., Lagor, W. R., Chapman, M. J., & Kontush, A. (2009). Proteomic analysis of defined hdl subpopulations reveals particle-specific protein clusters: Relevance to antioxidative function. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, *29*(6), 870–876. <https://doi.org/10.1161/ATVBAHA.109.186031>
- De Oliveira, C. B., Comunello, L. N., Lunardelli, A., Amaral, R. H., Pires, M. G. S., Da Silva,

- G. L., ... Gosmann, G. (2012). Phenolic enriched extract of *Baccharis trimera* presents anti-inflammatory and antioxidant activities. *Molecules*, *17*(1), 1113–1123. <https://doi.org/10.3390/molecules17011113>
- Deakin, S., Moren, X., & James, R. W. (2005). Very low density lipoproteins provide a vector for secretion of paraoxonase-1 from cells. *Atherosclerosis*, *179*(1), 17–25. <https://doi.org/10.1016/j.atherosclerosis.2004.08.039>
- DeChristopher, L. R., Uribarri, J., & Tucker, K. L. (2015). Intake of high fructose corn syrup sweetened soft drinks is associated with prevalent chronic bronchitis in U.S. Adults, ages 20–55 y. *Nutrition Journal*, *14*(1), 107. <https://doi.org/10.1186/s12937-015-0097-x>
- Derrickson, B., & Tortora, G. J. (2006). Sistema digestivo: estructura, órganos y funciones del sistema digestivo humano. Retrieved September 15, 2018, from Principios de anatomía y fisiología website: <https://www.anatolandia.com/2017/08/sistema-digestivo-humano-estructura-organos-funciones-sistema-digestivo.html>
- DiMarco, D., & Fernandez, M. (2015). The Regulation of Reverse Cholesterol Transport and Cellular Cholesterol Homeostasis by MicroRNAs. *Biology*, *4*(3), 494–511. <https://doi.org/10.3390/biology4030494>
- Dong, Chen, & Martinez, G. J. (2010). T cells: the usual subsets. *Nature Reviews Immunology*, *54*(1), 77030–77030. Retrieved from <http://www.mendeley.com/research/t-cells-usual-subsets-1/>
- dos Reis Lívero, F. A., da Silva, L. M., Ferreira, D. M., Galuppo, L. F., Borato, D. G., Prando, T. B. L., ... Acco, A. (2016). Hydroethanolic extract of *Baccharis trimera* promotes gastroprotection and healing of acute and chronic gastric ulcers induced by ethanol and acetic acid. *Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology*, *389*(9), 985–998. <https://doi.org/10.1007/s00210-016-1262-2>
- Embuscado, M. E. (2015). Spices and herbs: Natural sources of antioxidants - A mini review. *Journal of Functional Foods*, *18*, 811–819. <https://doi.org/10.1016/j.jff.2015.03.005>
- Falé, P. L., Amaral, F., Amorim Madeira, P. J., Sousa Silva, M., Florêncio, M. H., Frazão, F. N., & Serralheiro, M. L. M. (2012a). Acetylcholinesterase inhibition, antioxidant activity and toxicity of *Peumus boldus* water extracts on HeLa and Caco-2 cell lines. *Food and Chemical Toxicology*, *50*(8), 2656–2662. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2012.04.049>
- Falé, P. L., Amaral, F., Amorim Madeira, P. J., Sousa Silva, M., Florêncio, M. H., Frazão, F. N., & Serralheiro, M. L. M. (2012b). Acetylcholinesterase inhibition, antioxidant activity and toxicity of *Peumus boldus* water extracts on HeLa and Caco-2 cell lines. *Food and Chemical Toxicology*, *50*(8), 2656–2662. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2012.04.049>
- Ferreira Zielinski, A. A., Isidoro Haminiuk, C. W., Alberti, A., Nogueira, A., Demiate, I. M., & Granato, D. (2014). A comparative study of the phenolic compounds and the in vitro antioxidant activity of different Brazilian teas using multivariate statistical techniques. *Food Research International*, *60*, 246–254. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2013.09.010>
- Figuroa Pérez, M. G., Rocha-Guzmán, N. E., Mercado-Silva, E., Loarca-Piña, G., & Reynoso-Camacho, R. (2014). Effect of chemical elicitors on peppermint (*Mentha piperita*) plants and their impact on the metabolite profile and antioxidant

- capacity of resulting infusions. *Food Chemistry*, 156, 273–278. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2014.01.101>
- Fisher, E. A., Feig, J. E., Hewing, B., Hazen, S. L., & Smith, J. D. (2012). High-density lipoprotein function, dysfunction, and reverse cholesterol transport. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, 32(12), 2813–2820. <https://doi.org/10.1161/ATVBAHA.112.300133>
- Flaherty, D. (2012). Antibodies. In D. K. B. T.-I. for P. Flaherty (Ed.), *Immunology for Pharmacy* (pp. 70–78). <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/B978-0-323-06947-2.10009-4>
- Franco, R. R., da Silva Carvalho, D., de Moura, F. B. R., Justino, A. B., Silva, H. C. G., Peixoto, L. G., & Espindola, F. S. (2018). Antioxidant and anti-glycation capacities of some medicinal plants and their potential inhibitory against digestive enzymes related to type 2 diabetes mellitus. *Journal of Ethnopharmacology*, 215(December 2017), 140–146. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2017.12.032>
- Gänger, S. (2015). World Trade in Medicinal Plants from Spanish America , 1717 – 1815. *Medical History*, 59(1), 44–62. <https://doi.org/10.1017/mdh.2014.70>
- Ghassan Riachi, L., & Bastos De Maria, C. A. (2017). Yerba mate: An overview of physiological effects in humans. *Journal of Functional Foods*, 38, 308–320. <https://doi.org/10.1016/j.jff.2017.09.020>
- Ginter, E., & Simko, V. (2013). New promising potential in fighting atherosclerosis: HDL and reverse cholesterol transport. *Bratislavské Lekárske Listy*, 114(3), 172–176. [https://doi.org/10.4149/BLL\\_2013\\_037](https://doi.org/10.4149/BLL_2013_037)
- Goh, S.-Y., Jasik, M., & Cooper, M. E. (2008). Agents in development for the treatment of diabetic nephropathy. *Expert Opinion on Emerging Drugs*, 13(3), 447–463. <https://doi.org/10.1517/14728214.13.3.447>
- González Flecha, F. L., Castello, P. R., Gagliardino, J. J., & Rossi, J. P. F. C. (2000). La glucosilación no enzimática de proteínas. Mecanismo y papel de la reacción en la diabetes y el envejecimiento. *Ciencia Al Día Internacional*, 3(2), 1–17. Retrieved from <http://www.ciencia.cl/CienciaAlDia/volumen3/numero2/articulos/articulo2.html>
- Gramza-Michałowska, A., Abramowski, Z., Jovel, E., & Heś, M. (2008). Antioxidant Potential of Herbs Extracts and Impact on Hepg2 Cells Viability. *ACTA Acta Sci. Pol., Technol. Aliment*, 7(4), 61–72.
- Griess, B., Tom, E., Domann, F., & Teoh-Fitzgerald, M. (2017). Extracellular superoxide dismutase and its role in cancer. *Free Radical Biology and Medicine*, 112(August), 464–479. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2017.08.013>
- Grigoras, A. G. (2017). Catalase immobilization—A review. *Biochemical Engineering Journal*, 117, 1–20. <https://doi.org/10.1016/j.bej.2016.10.021>
- Gugliucci, A. (2017). Paraoxonase 1 and Its Clinical Relevance. *The HDL Handbook: Biological Functions and Clinical Implications: Third Edition*, 187–208. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-812513-7.00009-4>
- Gugliucci, A., Bastos, D. H. M., Schulze, J., & Souza, M. F. F. (2009). Caffeic and chlorogenic acids in Ilex paraguariensis extracts are the main inhibitors of AGE generation by methylglyoxal in model proteins. *Fitoterapia*, 80(6), 339–344. <https://doi.org/10.1016/j.fitote.2009.04.007>
- Gugliucci, A., Caccavello, R., Kotani, K., Sakane, N., & Kimura, S. (2013). Enzymatic assessment of paraoxonase 1 activity on HDL subclasses: A practical zymogram

- method to assess HDL function. *Clinica Chimica Acta*, 415, 162–168. <https://doi.org/10.1016/j.cca.2012.10.044>
- Gugliucci, A., Hermo, R., Tsuji, M., & Kimura, S. (2006). Lower serum paraoxonase-I activity in type 2 diabetic patients correlates with nitrated apolipoprotein A-I levels. In *Clinica chimica acta; international journal of clinical chemistry* (Vol. 368). <https://doi.org/10.1016/j.cca.2006.01.011>
- Gugliucci, A., & Menini, T. (2015). Paraoxonase 1 and HDL maturation. *Clinica Chimica Acta*, 439, 5–13. <https://doi.org/10.1016/j.cca.2014.09.016>
- Halliwell, B., & Gutteridge, J. M. C. (1984). Oxygen toxicity, oxygen radicals, transition metals and disease. *Biochemical Journal*, 219(1), 1–14. <https://doi.org/10.1042/bj2190001>
- Hansson, G. K., Libby, P., Schönbeck, U., & Yan, Z.-Q. (2002). Innate and Adaptive Immunity in the Pathogenesis of Atherosclerosis. *Circulation Research*, 91(4), 281–291. <https://doi.org/10.1161/01.RES.0000029784.15893.10>
- Haslam, D. W., & James, W. P. T. (2005). Obesity. *Lancet*, 366(1), 1197–1210.
- Hegsted, D. M. (2000). *From chick nutrition to nutrition policy*. 20, 1–19.
- Hodnett, K., Hsieh, H. H., & van Rensburg, P. (2013). Nonlinearities in stock return prediction: A blended approach. *Journal of Applied Business Research*, 29(1), 7–22. <https://doi.org/10.1146/annurev.nutr.22.111401.144957>
- Hofmann, M. A., Drury, S., Fu, C., Qu, W., Taguchi, A., Lu, Y., ... Schmidt, A. M. (1999). RAGE mediates a novel proinflammatory axis: A central cell surface receptor for S100/calgranulin polypeptides. *Cell*, 97(7), 889–901. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(00\)80801-6](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(00)80801-6)
- Holgate, S. T. (2004). Cytokine and anti-cytokine therapy for the treatment of asthma and allergic disease. *Allergy International*, 53(2), 47–54. <https://doi.org/10.1111/j.1440-1592.2004.00329.x>
- Hollebeek, S., Borlon, F., Schneider, Y. J., Larondelle, Y., & Rogez, H. (2013). Development of a standardised human in vitro digestion protocol based on macronutrient digestion using response surface methodology. *Food Chemistry*, 138(2–3), 1936–1944. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2012.11.041>
- Hori, O., Brett, J., Slattery, T., Cao, R., Zhang, J., Chen, J. X., ... Schmidt, A. M. (1995). The Receptor for Advanced Glycation End Products (RAGE) Is a Cellular Binding Site for Amphotericin. *Journal of Biological Chemistry*, 270(43), 25752–25761. <https://doi.org/10.1074/jbc.270.43.25752>
- Horžić, D., Komes, D., Belščak, A., Ganić, K. K., Iveković, D., & Karlović, D. (2009). The composition of polyphenols and methylxanthines in teas and herbal infusions. *Food Chemistry*, 115(2), 441–448. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2008.12.022>
- Huang, D., Ou, B., & Prior, R. L. (2005). The Chemistry behind Antioxidant Capacity Assays. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53(6), 1841–1856. <https://doi.org/10.1021/jf030723c>
- Ighodaro, O. M., & Akinloye, O. A. (2017). First line defence antioxidants-superoxide dismutase (SOD), catalase (CAT) and glutathione peroxidase (GPX): Their fundamental role in the entire antioxidant defence grid. *Alexandria Journal of Medicine*, 1–7. <https://doi.org/10.1016/j.ajme.2017.09.001>
- Janeway, C. A., Travers, P., Walport, M., & Shlomchik, M. (2001). Immunobiology: The Immune System In Health And Disease. In E. L. Penelope Austin (Ed.), *Garland*

- Publishing* (Fifth). <https://doi.org/10.1111/j.1467-2494.1995.tb00120.x>
- Johnson, R. K., Appel, L. J., Brands, M., Howard, B. V., Lefevre, M., Lustig, R. H., ... Wylie-Rosett, J. (2009). Dietary sugars intake and cardiovascular health a scientific statement from the American Heart Association. *Circulation*, *120*(11), 1011–1020. <https://doi.org/10.1161/CIRCULATIONAHA.109.192627>
- Kalyanaraman, B. (2013). Teaching the basics of redox biology to medical and graduate students: Oxidants, antioxidants and disease mechanisms. *Redox Biology*, *1*(1), 244–257. <https://doi.org/10.1016/j.redox.2013.01.014>
- Kamiloglu, S., Capanoglu, E., Boyacioglu, D., Yilmaz, O., & Duran, A. F. (2014). Investigating the antioxidant potential of Turkish herbs and spices. *Quality Assurance and Safety of Crops & Foods*, *6*(2), 151–158. <https://doi.org/10.3920/QAS2012.237>
- Kapp, K., Hakala, E., Orav, A., Pohjala, L., Vuorela, P., Püssa, T., ... Raal, A. (2013). Commercial peppermint (*Mentha piperita* L.) teas: Antichlamydial effect and polyphenolic composition. *Food Research International*, *53*(2), 758–766. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2013.02.015>
- Karabina, S.-A. P., Lehner, A. N., Frank, E., Parthasarathy, S., & Santanam, N. (2005). Oxidative inactivation of paraoxonase—implications in diabetes mellitus and atherosclerosis. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects*, *1725*(2), 213–221. <https://doi.org/10.1016/j.bbagen.2005.07.005>
- Karadeniz, A., Cinbilgel, I., Gun, S. S., & Cetin, A. (2015). Antioxidant activity of some Turkish medicinal plants. *Natural Product Research*, *29*(24), 2308–2312. <https://doi.org/10.1080/14786419.2015.1005618>
- Karplus, P. A. (2015). A primer on peroxiredoxin biochemistry. *Free Radical Biology and Medicine*, *80*, 183–190. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2014.10.009>
- Keys, A. (1950). *The Relation in Man between Cholesterol Levels in the Diet and in the Blood*. Author (s): Ancel Keys Published by: American Association for the Advancement of Science Stable URL: <http://www.jstor.org/stable/1678621> *The Relation in Man between Cholesterol*. *112*(2899), 79–81.
- Khoddami, A., Wilkes, M. A., & Roberts, T. H. (2013). Techniques for analysis of plant phenolic compounds. *Molecules*, *18*(2), 2328–2375. <https://doi.org/10.3390/molecules18022328>
- Khoo, H. E., Azlan, A., Tang, S. T., & Lim, S. M. (2017). Anthocyanidins and anthocyanins: colored pigments as food, pharmaceutical ingredients, and the potential health benefits. *Food & Nutrition Research*, *61*(1), 1361779. <https://doi.org/10.1080/16546628.2017.1361779>
- Kontush, A., & Chapman, M. J. (2006). Antiatherogenic small, dense HDL—guardian angel of the arterial wall? *Nature Clinical Practice Cardiovascular Medicine*, *3*, 144. Retrieved from <http://dx.doi.org/10.1038/ncpcardio0500>
- Kontush, A., & Chapman, M. J. (2010). Antiatherogenic function of HDL particle subpopulations: Focus on antioxidative activities. *Current Opinion in Lipidology*, *21*(4), 312–318. <https://doi.org/10.1097/MOL.0b013e32833bc1>
- Kontush, A., Guérin, M., & Chapman, M. J. (2008). Spotlight on HDL-raising therapies: insights from the torcetrapib trials. *Nature Clinical Practice Cardiovascular Medicine*, *5*, 329. Retrieved from <http://dx.doi.org/10.1038/ncpcardio1191>
- Kontush, A., & John Chapman, M. (2008). Why is HDL functionally deficient in type 2 diabetes? *Current Diabetes Reports*, *8*(1), 51–59. <https://doi.org/10.1007/s11892->

008-0010-5

- Lawrence, T. (2009). The nuclear factor NF-kappaB pathway in inflammation. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 1(6), 1–10. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a001651>
- Ledgerwood, E. C., Marshall, J. W. A., & Weijman, J. F. (2017). The role of peroxiredoxin 1 in redox sensing and transducing. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 617, 60–67. <https://doi.org/10.1016/j.abb.2016.10.009>
- Levine, R. L., & Stadtman, E. R. (2001). Oxidative modification of proteins during aging. *Experimental Gerontology*, 36(9), 1495–1502. [https://doi.org/10.1016/S0531-5565\(01\)00135-8](https://doi.org/10.1016/S0531-5565(01)00135-8)
- Li, J. M., & Shah, A. M. (2003). Mechanism of endothelial cell NADPH oxidase activation by angiotensin II: Role of the p47phox subunit. *Journal of Biological Chemistry*, 278(14), 12094–12100. <https://doi.org/10.1074/jbc.M209793200>
- Libby, P., Ridker, P. M., & Hansson, G. K. (2009). Inflammation in Atherosclerosis. From Pathophysiology to Practice. *Journal of the American College of Cardiology*, 54(23), 2129–2138. <https://doi.org/10.1016/j.jacc.2009.09.009>
- Litescu, S. C., Eremia, S. A. V., Tache, A., Vasilescu, I., & Radu, G. L. (2014). The Use of Oxygen Radical Absorbance Capacity (ORAC) and Trolox Equivalent Antioxidant Capacity (TEAC) Assays in the Assessment of Beverages' Antioxidant Properties. In *Processing and Impact on Antioxidants in Beverages*. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-404738-9.00025-8>
- Lo, C. Y., Hsiao, W. T., & Chen, X. Y. (2011). Efficiency of trapping methylglyoxal by phenols and phenolic acids. *Journal of Food Science*, 76(3), 90–96. <https://doi.org/10.1111/j.1750-3841.2011.02067.x>
- Luncefond, N., & Gugliucci, A. (2005). Ilex paraguariensis extracts inhibit AGE formation more efficiently than green tea. *Fitoterapia*, 76(5), 419–427. <https://doi.org/10.1016/j.fitote.2005.03.021>
- Mahdavi, F., Saharkhiz, M. J., & Karami, A. (2017). Defensive response of radish seedlings to the oxidative stress arising from phenolic compounds in the extract of peppermint (*Mentha × piperita* L.). *Scientia Horticulturae*, 214, 133–140. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2016.11.029>
- Mahmoudi, M. (2018). The pathogenesis of atherosclerosis. *Medicine*, 1–4. <https://doi.org/10.1016/j.mpmed.2018.06.010>
- Maillard, I., Fang, T., & Pear, W. S. (2005). Regulation of Lymphoid Development, Differentiation, and Function By the Notch Pathway. *Annual Review of Immunology*, 23(1), 945–974. <https://doi.org/10.1146/annurev.immunol.23.021704.115747>
- Malik, V. S., & Hu, F. B. (2015). Fructose and Cardiometabolic Health What the Evidence from Sugar-Sweetened Beverages Tells Us. *Journal of the American College of Cardiology*, 66(14), 1615–1624. <https://doi.org/10.1016/j.jacc.2015.08.025>
- Manach, C., Williamson, G., Morand, C., Scalbert, A., & Rémésy, C. (2005). Bioavailability and bioefficacy of poly-phenols in humans, II: Review of 93 intervention studies. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 81, 2435–2555. <https://doi.org/81/1/230S> [pii]
- Marcotullio, M. C., Curini, M., & Becerra, J. X. (2018). An Ethnopharmacological, Phytochemical and Pharmacological Review on Lignans from Mexican *Bursera*

- spp. *Molecules*, 23(1976), 1–20. <https://doi.org/10.3390/molecules23081976>
- Mastropietro, G., Tiscornia, I., Perelmuter, K., Astrada, S., & Bollati-Fogolín, M. (2015). HT-29 and Caco-2 reporter cell lines for functional studies of nuclear factor kappa B activation. *Mediators of Inflammation*, 2015, 1–13. <https://doi.org/10.1155/2015/860534>
- Mateos, R., Baeza, G., Sarriá, B., & Bravo, L. (2018). Improved LC-MS characterization of hydroxycinnamic acid derivatives and flavonols in different commercial mate (*Ilex paraguariensis*) brands. Quantification of polyphenols, methylxanthines, and antioxidant activity. *Food Chemistry*, 241(October 2016), 232–241. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2017.08.085>
- Matsuda, H., Wang, T., Managi, H., & Yoshikawa, M. (2003). Structural requirements of flavonoids for inhibition of protein glycation and radical scavenging activities. *Bioorganic and Medicinal Chemistry*, 11(24), 5317–5323. <https://doi.org/10.1016/j.bmc.2003.09.045>
- Matsumoto, H., Inaba, H., Kishi, M., Tominaga, S., Masao, H., & Tsuda, T. (2001). Orally Administered Delphinidin 3-Rutinoside and Cyanidin 3-Rutinoside Are Directly Absorbed in Rats and Humans and Appear in the Blood as the Intact Forms. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 49(3), 1546–1551.
- McBroom MPH, M. M. (2015). Eosinophil granulocyte. *Salem Press Encyclopedia of Health*. Retrieved from <http://proxy.timbo.org.uy:443/login?url=http://search.ebscohost.com/login.aspx?direct=true&db=ers&AN=87998847&lang=es&site=eds-live>
- Meijer, K., Vonk, R. J., Priebe, M. G., & Roelofsen, H. (2015). Cell-based screening assay for anti-inflammatory activity of bioactive compounds. *Food Chemistry*, 166, 158–164. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2014.06.053>
- Menezes, A. P. S., da Silva, J., Fisher, C., da Silva, F. R., Reyes, J. M., Picada, J. N., ... Ferraz, A. de B. F. (2016). Chemical and toxicological effects of medicinal *Baccharis trimera* extract from coal burning area. *Chemosphere*, 146, 396–404. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2015.12.028>
- Menini, T., Heck, C., Schulze, J., De Mejia, E., & Gugliucci, A. (2007). Protective action of *Ilex paraguariensis* extract against free radical inactivation of paraoxonase-1 in high-density lipoprotein. *Planta Medica*, 73(11), 1141–1147. <https://doi.org/10.1055/s-2007-981585>
- Merino, M. C., & Gruppi, A. (2006). Características de las células B1. *Biochemistry and Cell Biology*, 66(2), 165–172.
- Miliauskas, G., Venskutonis, P. R., & Van Beek, T. A. (2004). Screening of radical scavenging activity of some medicinal and aromatic plant extracts. *Food Chemistry*, 85(2), 231–237. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2003.05.007>
- Ministerio de Desarrollo Social. (2015). Salud. In C. Piñeyro & G. Ayala (Eds.), *Reporte Uruguay* (Primera, p. 333). Retrieved from [www.opp.gub.uy/hacemos/presupuesto/agev](http://www.opp.gub.uy/hacemos/presupuesto/agev)
- Monaco, C., Andreakos, E., Kiriakidis, S., Mauri, C., Bicknell, C., Foxwell, B., ... Feldmann, M. (2004). Canonical pathway of nuclear factor kappa B activation selectively regulates proinflammatory and prothrombotic responses in human atherosclerosis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 101(15), 5634–5639. <https://doi.org/10.1073/pnas.0401060101>

- Mori, T. A. (2017). Marine OMEGA-3 fatty acids in the prevention of cardiovascular disease. *Fitoterapia*, 123(September), 51–58. <https://doi.org/10.1016/j.fitote.2017.09.015>
- Mullarkey, C. J., Edelstein, D., & Brownlee, M. (1990). Free radical generation by early glycation products: a mechanism for accelerated atherogenesis in diabetes. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 173(3), 932–939.
- Munin, A., & Edwards-Lévy, F. (2011). Encapsulation of natural polyphenolic compounds; a review. In *Pharmaceutics* (Vol. 3). <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics3040793>
- Najafian, S., Moradi, M., & Sepehrimanesh, M. (2016). Polyphenolic contents and antioxidant activities of two medicinal plant species, *Mentha piperita* and *Stevia rebaudiana*, cultivated in Iran. *Comparative Clinical Pathology*, 25(4), 743–747. <https://doi.org/10.1007/s00580-016-2258-5>
- Nakano, M., Stephen, J., Kramer, M. C. A., Ladich, E. R., Kolodgie, F. D., & Virmani, R. (2013). Insights into the Natural History of Atherosclerosis Progression. In A. J. Taylor & T. C. Villines (Eds.), *Atherosclerosis: Clinical Perspectives Through Imaging* (pp. 3–12). Springer-Verlag London.
- Namal Senanayake, S. P. J. (2013). Green tea extract: Chemistry, antioxidant properties and food applications - A review. *Journal of Functional Foods*, 5(4), 1529–1541. <https://doi.org/10.1016/j.jff.2013.08.011>
- Navab, M., Reddy, S. T., Van Lenten, B. J., & Fogelman, A. M. (2011). HDL and cardiovascular disease: atherogenic and atheroprotective mechanisms. *Nature Reviews Cardiology*, 8, 222. Retrieved from <http://dx.doi.org/10.1038/nrcardio.2010.222>
- Neeraj, T., Prakash, A., & Seema, Y. (2008). Antimicrobial Activity and Medicinal Values of Essential Oil of *Mentha Piperita* L. *Certified International Journal of Engineering and Innovative Technology*, 9001(8), 2277–3754.
- O'Brien, P., Carrasco-Pozo, C., & Speisky, H. (2006). Boldine and its antioxidant or health-promoting properties. *Chemico-Biological Interactions*, 159(1), 1–17. <https://doi.org/10.1016/j.cbi.2005.09.002>
- Ogurlur, I., Kiykim, A., Baris, S., Ozen, A., Yuces, E. G., & Karakoc-Aydiner, E. (2017). Basophil activation test for inhalant allergens in pediatric patients with allergic rhinitis. *International Journal of Pediatric Otorhinolaryngology*, 97, 197–201. <https://doi.org/10.1016/j.ijporl.2017.04.006>
- Okamoto, T., Yamagishi, S. ichi, Inagaki, Y., Amano, S., Koga, K., Abe, R., ... Makita, Z. (2002). Angiogenesis induced by advanced glycation end products and its prevention by cerivastatin. *The FASEB Journal: Official Publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*, 16(14), 1928–1930. <https://doi.org/10.1096/fj.02-0030fje>
- Ou, B., Hampsch-Woodill, M., & Prior, R. L. (2001). Development and Validation of an Improved Oxygen Radical Absorbance Capacity Assay Using Fluorescein as the Fluorescent Probe. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 49(10), 4619–4626. <https://doi.org/10.1021/jf010586o>
- Ozkan, G., Kamiloglu, S., Ozdal, T., Boyacioglu, D., & Capanoglu, E. (2016). Potential Use of Turkish Medicinal Plants in the Treatment of Various Diseases. *Molecules*, 21(257), 1–33. <https://doi.org/10.3390/molecules21030257>
- Pádua, B. D. C., Rossoni Júnior, J. V., De Brito Magalhães, C. L., Chaves, M. M., Silva, M.

- E., Pedrosa, M. L., ... Costa, D. C. (2014). Protective effect of *Baccharis trimera* extract on acute hepatic injury in a model of inflammation induced by acetaminophen. *Mediators of Inflammation*, 2014. <https://doi.org/10.1155/2014/196598>
- Pereira, E., Pimenta, A. I., Calhella, R. C., Antonio, A. L., Verde, S. C., Barros, L., ... Ferreira, I. C. F. R. (2016). Effects of gamma irradiation on cytotoxicity and phenolic compounds of *Thymus vulgaris* L. and *Mentha x piperita* L. *LWT - Food Science and Technology*, 71, 370–377. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2016.04.004>
- Peyroux, J., & Sternberg, M. (2006). Advanced glycation endproducts (AGEs): pharmacological inhibition in diabetes. *Pathologie Biologie*, 54(7), 405–419. <https://doi.org/10.1016/j.patbio.2006.07.006>
- Prieto Martín, A., Barbarroja Escudero, J., García Torrijos, C., & Monserrat Sanz, J. (2013). Linfocitos B. *Medicine (Spain)*, 11(28), 1710–1719. [https://doi.org/10.1016/S0304-5412\(13\)70547-X](https://doi.org/10.1016/S0304-5412(13)70547-X)
- Prior, R. L. (2015). Oxygen radical absorbance capacity (ORAC): New horizons in relating dietary antioxidants/bioactives and health benefits. *Journal of Functional Foods*, 18, 797–810. <https://doi.org/10.1016/j.jff.2014.12.018>
- Qahtany, A., M, F. H., Shali, H. Al, & Bayamin, A. A. (2018). *Atherosclerosis: Pathophysiology and Management*. 70(January), 82–87. <https://doi.org/10.12816/0042966>
- Rabelo, A. C. S., Araújo, G. R. de, Lúcio, K. de P., Araújo, C. M., Miranda, P. H. de A., Silva, B. de M., ... Costa, D. C. (2017). Aqueous extract of *Baccharis trimera* improves redox status and decreases the severity of alcoholic hepatotoxicity. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, 1–10. <https://doi.org/10.1016/j.bjp.2017.09.003>
- Raina, H., Soni, G., Jauhari, N., Sharma, N., & Bharadvaja, N. (2014). Phytochemical importance of medicinal plants as potential sources of anticancer agents. *Turkish Journal of Botany*, 38, 1027–1035. <https://doi.org/10.3906/bot-1405-93>
- Ramkissoon, J. S., Mahomoodally, M. F., Ahmed, N., & Subratty, A. H. (2013). Antioxidant and anti-glycation activities correlates with phenolic composition of tropical medicinal herbs. *Asian Pacific Journal of Tropical Medicine*, 6(7), 561–569. [https://doi.org/10.1016/S1995-7645\(13\)60097-8](https://doi.org/10.1016/S1995-7645(13)60097-8)
- Raquel Rosa Directora División Epidemiología Dra Marlene Sica Directora Dirección General de la Salud, D. (2013). INDICADORES DE MORBILIDAD Uruguay OPS. *Msp*. Retrieved from [http://www.msp.gub.uy/sites/default/files/archivos\\_adjuntos/OPS\\_INDICADORES\\_2013.pdf](http://www.msp.gub.uy/sites/default/files/archivos_adjuntos/OPS_INDICADORES_2013.pdf)
- Rasheed, S., Sánchez, S. S., Yousuf, S., Honoré, S. M., & Choudhary, M. I. (2018). Drug repurposing: In-vitro anti-glycation properties of 18 common drugs. *PLoS ONE*, 13(1), 1–9. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0190509>
- Rauf, A., Patel, S., Imran, M., AneelaMaalik, Arshad, M. U., Saeed, F., ... Elsharkawy, E. (2018). Honokiol: An anticancer lignan. *Biomedicine and Pharmacotherapy*, 107(July), 555–562. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2018.08.054>
- Re, R., Pellegrini, N., Proteggente, A., Pannala, A., Yang, M., & Rice-Evans, C. (1999). Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Radical Biology and Medicine*, 26(9), 1231–1237. [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0891-5849\(98\)00315-3](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0891-5849(98)00315-3)

- Reddy, S. T., Devarajan, A., Bourquard, N., Shih, D., & Fogelman, A. M. (2008). Is it just paraoxonase 1 or are other members of the paraoxonase gene family implicated in atherosclerosis? *Current Opinion in Lipidology*, 19(4). Retrieved from [https://journals.lww.com/co-lipidology/Fulltext/2008/08000/Is\\_it\\_just\\_paroaxonase\\_1\\_or\\_are\\_other\\_member\\_s\\_of.12.aspx](https://journals.lww.com/co-lipidology/Fulltext/2008/08000/Is_it_just_paroaxonase_1_or_are_other_member_s_of.12.aspx)
- Reis, L. C. B., De Souza, C. O., Da Silva, J. B. A., Martins, A. C., Nunes, I. L., & Druzian, J. I. (2015). Active biocomposites of cassava starch: The effect of yerba mate extract and mango pulp as antioxidant additives on the properties and the stability of a packaged product. *Food and Bioproducts Processing*, 94(May), 382–391. <https://doi.org/10.1016/j.fbp.2014.05.004>
- Reiter, R. J., Acuna-Castroviejo, D., Tan, D. X., & Burkhardt, S. (2001). Free radical-mediated molecular damage. Mechanisms for the protective actions of melatonin in the central nervous system. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 939, 200–215.
- Reza, H. M., Gias, Z. T., Islam, P., Sabnam, S., Jain, P., Hossain, M. H., & Alam, M. A. (2015). HPLC-DAD System-Based Phenolic Content Analysis and In Vitro Antioxidant Activities of Rice Bran Obtained from Aush Dhan (*Oryza Sativa*) of Bangladesh. *Journal of Food Biochemistry*, 39(4), 462–470. <https://doi.org/10.1111/jfbc.12154>
- Ridker, P. M., Genest, J., Boekholdt, S. M., Libby, P., Gotto, A. M., Nordestgaard, B. G., ... Kastelein, J. J. P. (2010). HDL cholesterol and residual risk of first cardiovascular events after treatment with potent statin therapy: An analysis from the JUPITER trial. *The Lancet*, 376(9738), 333–339. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(10\)60713-1](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(10)60713-1)
- Rodríguez Vaquero, M. J., Tomassini Serravalle, L. R., Manca de Nadra, M. C., & Strasser de Saad, A. M. (2010). Antioxidant capacity and antibacterial activity of phenolic compounds from argentinean herbs infusions. *Food Control*, 21(5), 779–785. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2009.10.017>
- Rojas, A., Figueroa, H., & Morales, E. (2010). Fueling inflammation at tumor microenvironment: The role of multiligand/rage axis. *Carcinogenesis*, 31(3), 334–341. <https://doi.org/10.1093/carcin/bgp322>
- Rongvaux, A. (2018). Innate immunity and tolerance toward mitochondria. *Mitochondrion*, 41(October 2017), 14–20. <https://doi.org/10.1016/j.mito.2017.10.007>
- Sabir, S. M., Athayde, M. L., Boligon, A. A., & Rocha, J. B. T. (2017). Antioxidant activities and phenolic profile of *Baccharis trimera*, a commonly used medicinal plant from Brazil. *South African Journal of Botany*, 113, 318–323. <https://doi.org/10.1016/j.sajb.2017.09.010>
- Sacks, F. M., Lichtenstein, A. H., Wu, J. H. Y., Appel, L. J., Creager, M. A., Kris-Etherton, P. M., ... Van Horn, L. V. (2017). Dietary fats and cardiovascular disease: A presidential advisory from the American Heart Association. *Circulation*, 136(3), e1–e23. <https://doi.org/10.1161/CIR.0000000000000510>
- Sala, A., Folco, G., & Murphy, R. C. (2016). Transcellular biosynthesis of eicosanoids. *Pharmacology Reports*, 42(2), 407–420. <https://doi.org/10.1002/jmri.24785>. Free Breathing
- Sawai, Y., Kohsaka, K., Nishiyama, Y., & Ando, K. (1987). Serum concentrations of

- rutoside metabolites after oral administration of a rutoside formulation to humans. *Arzneimittel-Forschung*, 37(6), 729–732.
- Schaefer, E. J. (2010). Introduction to High-Density Lipoprotein, Dyslipidemia, and Coronary Heart Disease. In E. J. Schaefer (Ed.), *High Density Lipoproteins, Dyslipidemia, and Coronary Heart Disease* (pp. 1–14). <https://doi.org/10.1007/978-1-4419-1059-2>
- Scheirer Ed.D., R. (2013). Gastrointestinal system. *Salem Press Encyclopedia of Science*. Retrieved from <http://proxy.timbo.org.uy:443/login?url=http://search.ebscohost.com/login.aspx?direct=true&db=ers&AN=87690339&lang=es&site=eds-live>
- Seo, D., & Goldschmidt-Clermont, P. (2009). The paraoxonase gene family and atherosclerosis. *Current Atherosclerosis Reports*, 11(3), 182–187. <https://doi.org/10.1007/s11883-009-0029-3>
- Seo, M. J., & Oh, D. K. (2017). Prostaglandin synthases: Molecular characterization and involvement in prostaglandin biosynthesis. *Progress in Lipid Research*, 66(April), 50–68. <https://doi.org/10.1016/j.plipres.2017.04.003>
- Sharma, C., Kaur, A., Thind, S. S., Singh, B., & Raina, S. (2015). Advanced glycation End-products (AGEs): an emerging concern for processed food industries. *Journal of Food Science and Technology*, 52(12), 7561–7576. <https://doi.org/10.1007/s13197-015-1851-y>
- Sheposh, R. (2016a). Neutrophil. *Salem Press Encyclopedia of Health*. Retrieved from <http://proxy.timbo.org.uy:443/login?url=http://search.ebscohost.com/login.aspx?direct=true&db=ers&AN=87323280&lang=es&site=eds-live>
- Sheposh, R. (2016b). Renin-angiotensin system (RAS). *Salem Press Encyclopedia of Health*. Retrieved from <http://proxy.timbo.org.uy:443/login?url=http://search.ebscohost.com/login.aspx?direct=true&db=ers&AN=87998985&lang=es&site=eds-live>
- Sies, H., & E. Cadenas. (1985). Oxidative stress: damage to intact cells and organs. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London. B, Biological Sciences*, 311(1152), 617 LP-631. Retrieved from <http://rstb.royalsocietypublishing.org/content/311/1152/617.abstract>
- Simirgiotis, M. J., & Schmeda-Hirschmann, G. (2010). Direct identification of phenolic constituents in Boldo Folium (*Peumus boldus* Mol.) infusions by high-performance liquid chromatography with diode array detection and electrospray ionization tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, 1217(4), 443–449. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2009.11.014>
- Singh, R. J., Hogg, N., Joseph, J., Konorev, E., & Kalyanaraman, B. (1999). The peroxy nitrite generator, SIN-1, becomes a nitric oxide donor in the presence of electron acceptors. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 361(2), 331–339. <https://doi.org/10.1006/abbi.1998.1007>
- Slinkard, K., & L. Singleton, V. (1977). Total Phenol Analysis: Automation and Comparison with Manual Methods. In *American Journal of Enology and Viticulture* (Vol. 28).
- Soto, C., Caballero, E., Pérez, E., & Zúñiga, M. E. (2014). Effect of extraction conditions on total phenolic content and antioxidant capacity of pretreated wild *Peumus boldus* leaves from Chile. *Food and Bioprocess Processing*, 92(3), 328–333. <https://doi.org/10.1016/j.fbp.2013.06.002>

- Su-Chen, H., Pei -Wen, C., Hui-Ting, T., & Pin-Yuan, Y. (2014). Inhibition of fluorescent advanced glycation end-products and n-carboxymethyllysine formation by several floral herbal infusions. *International Journal of Food Properties*, 17(3), 617–628. <https://doi.org/10.1080/10942912.2012.654566>
- Sun, J., Sukhova, G. K., Wolters, P. J., Yang, M., Kitamoto, S., Libby, P., ... Shi, G. P. (2007). Mast cells promote atherosclerosis by releasing proinflammatory cytokines. *Nature Medicine*, 13(6), 719–724. <https://doi.org/10.1038/nm1601>
- Tak, P. P., Firestein, G. S., Tak, P. P., & Firestein, G. S. (2001). NF-kappaB: a key role in inflammatory diseases. *The Journal of Clinical Investigation*, 107(1), 7–11. <https://doi.org/10.1172/JCI11830>
- Taylor, R. S., Ashton, K. E., Moxham, T., Hooper, L., & Ebrahim, S. (2011). Reduced dietary salt for the prevention of cardiovascular disease. *Cochrane Database of Systematic Reviews (Online)*, (7), CD009217. <https://doi.org/10.1002/14651858.CD009217>
- Technology, P., Procedure, S. O., & View, P. D. (2014). *a General Review on Maillard*. (September 2009).
- Teker, E., Akadam-Teker, A. B., Ozturk, O., Eronat, A. P., Yalin, K., Golcuk, S. E., & Bugra, Z. (2018). Association Between the Interferon Gamma 874 T/A Polymorphism and the Severity of Valvular Damage in Patients with Rheumatic Heart Disease. *Biochemical Genetics*, 56(3), 225–234. <https://doi.org/10.1007/s10528-017-9839-0>
- Thornalley, P. J. (2003). Use of aminoguanidine (Pimagedine) to prevent the formation of advanced glycation endproducts. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 419(1), 31–40. <https://doi.org/10.1016/j.abb.2003.08.013>
- Tward, A. (2002). Decreased Atherosclerotic Lesion Formation in Human Serum Paraoxonase Transgenic Mice. *Circulation*, 106(4), 484–490. <https://doi.org/10.1161/01.CIR.0000023623.87083.4F>
- Uribarri, J., Dolores, M., Pía, M., Maza, D., Filip, R., Gugliucci, A., ... Wrobel, K. (2015). Dietary Advanced Glycation End Products and Their Role in Health and Disease 1 , 2. *Advances in Nutrition*, 6, 461–473. [https://doi.org/10.3945/an.115.008433.\(RAGEs\)](https://doi.org/10.3945/an.115.008433.(RAGEs))
- Uribe, E., Marín, D., Vega-Gálvez, A., Quispe-Fuentes, I., & Rodríguez, A. (2016). Assessment of vacuum-dried peppermint (*Mentha piperita* L.) as a source of natural antioxidants. *Food Chemistry*, 190, 559–565. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2015.05.108>
- Valko, M., Leibfritz, D., Moncol, J., Cronin, M. T. D., Mazur, M., & Telser, J. (2007). Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *International Journal of Biochemistry and Cell Biology*, 39(1), 44–84. <https://doi.org/10.1016/j.biocel.2006.07.001>
- Vargas Klimaczewski, C., de Aquino Saraiva, R., Roos, D. H., Boligon, A., Linde Athayde, M., Kamdem, J. P., ... Teixeira Rocha, J. B. (2014). Antioxidant activity of *Peumus boldus* extract and alkaloid boldine against damage induced by Fe(II)-citrate in rat liver mitochondria in vitro. *Industrial Crops and Products*, 54, 240–247. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2013.11.051>
- WHO. (2013). Global action plan for the prevention and control of noncommunicable diseases 2013-2020. *World Health Organization*, 102. [https://doi.org/978\\_92\\_4\\_1506236](https://doi.org/978_92_4_1506236)

- Williams, P. T., & Feldman, D. E. (2011). Prospective study of coronary heart disease vs. HDL2, HDL3, and other lipoproteins in Gofman's Livermore Cohort. *Atherosclerosis*, 214(1), 196–202. <https://doi.org/10.1016/j.atherosclerosis.2010.10.024>
- Williams, R. O., Paleolog, E., & Feldmann, M. (2007). Cytokine inhibitors in rheumatoid arthritis and other autoimmune diseases. *Current Opinion in Pharmacology*, 7(4), 412–417. <https://doi.org/10.1016/j.coph.2007.06.001>
- Wojdyło, A., Oszmiański, J., & Czemerys, R. (2007). Antioxidant activity and phenolic compounds in 32 selected herbs. *Food Chemistry*, 105(3), 940–949. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2007.04.038>
- World Health Organization. (2018). Noncommunicable diseases.
- Yan, Y., Tan, C. K., Wu, H., Wang, S., & Huang, D. (2014). Nitrogen Dioxide Absorbance Capacity of Flavanols Quantified by a NO<sub>2</sub>-Selective Fluorescent Probe. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 62(23), 5253–5258. <https://doi.org/10.1021/jf5001925>
- Zheng, W., & Wang, S. Y. (2001). Antioxidant Activity and Phenolic Compounds in Selected Herbs. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 49, 5165–5170. <https://doi.org/10.1021/JF010697N>
- Žlabur, J. Š., Voća, S., Dobričević, N., Pliestić, S., Galić, A., Boričević, A., & Borić, N. (2016). Ultrasound-assisted extraction of bioactive compounds from lemon balm and peppermint leaves. *International Agrophysics*, 30(1), 95–104. <https://doi.org/10.1515/intag-2015-0077>
- Zulueta, A., Esteve, M. J., & Frígola, A. (2009). ORAC and TEAC assays comparison to measure the antioxidant capacity of food products. *Food Chemistry*, 114(1), 310–316. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2008.09.033>