

## Comparación del contenido fenólico, capacidad antioxidante y actividad antiinflamatoria de infusiones herbales comerciales\*

### Comparison of phenolic content, antioxidant capacity and anti-inflammatory activity of commercial herbal infusions

Erika Elizabeth Muñoz-Velázquez, Karla Rivas-Díaz, Ma. Guadalupe Flavia Loarca-Piña, Sandra Mendoza-Díaz, Rosalía Reynoso-Camacho y Minerva Ramos-Gómez<sup>§</sup>

Programa en Alimentos del Centro de la República (PROPAC). Facultad de Química. Universidad Autónoma de Querétaro, C. U. Cerro de las Campanas s/n, Querétaro, Querétaro, 76010. Tel: (442) 192-1307. Ext. 5577. Fax: (442)192-1304. <sup>§</sup>Autora para correspondencia: ramosgomez@yahoo.com.

#### Resumen

En la actualidad, hay un incremento en el consumo de infusiones debido a sus propiedades benéficas, las cuales se atribuyen a la presencia de compuestos fenólicos. Por lo anterior, el objetivo de este estudio fue evaluar el contenido fenólico, la capacidad antioxidante y la actividad antiinflamatoria de infusiones comerciales de hierbabuena (*Mentha piperita* L.), limón (*Cymbopogon citratos*), manzanilla (*Matricaria chamomilla* L.), árnica (*Heterotheca inuloides*) y boldo (*Peumus boldus* Molina) obtenidas en un supermercado en 2009. El contenido de fenoles y la capacidad antioxidante se determinaron por técnicas espectrofotométricas. Adicionalmente, la identificación y cuantificación de compuestos fenólicos también se llevó a cabo por HPLC. La actividad antiinflamatoria se evaluó mediante la inhibición de la enzima ciclooxigenasa-2 (COX-2). La infusión de boldo presentó el mayor contenido de compuestos fenólicos y la mayor capacidad antioxidante medida por la técnicas ABT, seguida de las infusiones de hierbabuena por el método de FRAP. En las infusiones evaluadas se identificaron diez diferentes compuestos, encontrándose en mayor concentración los compuestos catequina, epigallocatequina galato, ácido rosmarínico y eriocitrina. En cuanto a la capacidad inhibitoria sobre

#### Abstract

Actually there is an increase on infusion consumption due their beneficial properties, which are attributable to the presence of phenolic compounds. By this reason, the aim of this study was to assess phenolic content, antioxidant capacity and anti-inflammatory capacity of commercial infusions of peppermint (*Mentha piperita* L.), lemon grass (*Cymbopogon citratos*), chamomile (*Matricaria chamomilla* L.), arnica (*Heterotheca inuloides*) and boldo (*Peumus boldus* Molina) obtained in supermarket in 2009. Phenols content and antioxidant capacity were defined by spectrophotometry techniques. Also, identification and quantification of phenolic compound was made by HPLC. The anti-inflammatory activity was assessed by inhibition of ciclooxigenasa-2 (COX-2) enzyme. Boldo infusion had greatest content of phenolic compounds and greater antioxidant capacity measured by ABT techniques, followed by chamomile infusions by FRAP method. In assessed infusions ten different compounds were identified, finding in higher concentration the compounds catechin, epigallocatechin gallate, rosmarinic acid and eriocitrin. As for inhibitory capacity on COX-2, chamomile and lemon samples had higher percentages of inhibition, followed by boldo infusion. In general, results

\* Recibido: agosto de 2011  
Aceptado: febrero de 2012

COX-2, las muestras de manzanilla y limón presentaron los mayores porcentajes de inhibición, seguida de la infusión de boldo. En general, los resultados sugieren que las infusiones comerciales de boldo y hierbabuena muestran propiedades biológicas con beneficios potenciales a la salud.

**Palabras clave:** *Peumus boldus*, *Mentha piperita* L., *Matricaria chamomilla* L., capacidad antioxidante, inhibición de COX-2.

## Introducción

La inflamación es un proceso dinámico que se inicia en respuesta a daños mecánicos, quemaduras, infecciones microbianas y otros estímulos que pueden afectar el bienestar del individuo (Abbas y Lichtman, 2003; Sikora *et al.*, 2008). Este proceso involucra la síntesis de mediadores locales inflamatorios como las prostaglandinas (PGs) inducidas por la enzima ciclooxigenasa-2 (COX-2). La biosíntesis de PGs está regulada por la fosfolipasa A<sub>2</sub> (PLA<sub>2</sub>), la cual cataliza la hidrólisis de fosfolípidos de la membrana, permitiendo la formación de ácidos grasos libres, como el ácido araquidónico (AA) y lisofosfolípidos. Ambos metabolitos fosfolípidicos actúan como precursores de mediadores inflamatorios como los eicosanoides (Meyer *et al.*, 2005). Éstos compuestos están asociados con desórdenes inflamatorios de tipo agudo, así como crónico, por lo que la identificación de inhibidores de COX-2 con propiedades antiinflamatorias más seguras está en continuo desarrollo (Wiert, 2007).

En varios modelos animales se ha demostrado que algunos flavonoides inhiben la inflamación crónica a través de diversos mecanismos (Rahman *et al.*, 2006; Singh *et al.*, 2010). Dichos compuestos han mostrado actividad antioxidante y de barrido de radicales, así como la capacidad de regular diversas actividades celulares, como la actividad enzimática de COX. Por lo anterior, el efecto inhibitorio de los flavonoides sobre esta enzima se considera uno de los mecanismos antiinflamatorios celulares más importantes (Surh *et al.*, 2001). Por lo tanto, es importante la identificación de fuentes con alto contenido de flavonoides que sean aceptadas por la población en general. A este respecto, el consumo de bebidas, como las infusiones, es una opción accesible para proveer de este tipo de compuestos (Høstmark, 2010).

suggest that boldo and peppermint commercial infusions show biological properties with potential benefits for health.

**Key words:** *Peumus boldus*, *Mentha piperita* L., *Matricaria chamomilla* L., antioxidant capacity, COX-2 inhibition.

## Introduction

Inflammation is a dynamic process that starts in response to mechanical damages, burns, microbial infections and other stimulations that can affect individual's wellbeing (Abbas and Lichtman, 2003; Sikora *et al.*, 2008). This process involves synthesis of inflammatory local mediators like prostaglandins (PGs) induced by cyclooxygenase-2 enzyme (COX-2). PGs biosynthesis is ruled by phospholipase A<sub>2</sub> (PLA<sub>2</sub>), which catalyzes the hydrolysis of phospholipids from the membrane, allowing formation of free fatty acids, like arachidonic acid (AA) and lysophospholipids. Both phospholipids metabolites act like precursors of inflammatory mediators like eicosanoids (Meyer *et al.*, 2005). These compounds are associated with acute type inflammatory disorders, as well as chronic; therefore identification of COX-2 inhibitors with safer anti-inflammatory properties is continuously developing (Wiert, 2007).

In several animal models has been proven that some flavonoids inhibit chronic inflammation through several mechanisms (Rahman *et al.*, 2006; Singh *et al.*, 2010). Such compounds have shown antioxidant activity and radicals' removal, as well as capacity to rule several cell activities, like COX enzymatic activity. By this reason, the flavonoids inhibitory effect on this enzyme is considered one of the most important anti-inflammatory cell mechanisms (Surh *et al.*, 2001). Therefore, identification of sources with high flavonoids content that are accepted by population in general is important. In this matter, beverage consumption, like infusions, is a feasible option to supply this kind of compounds (Høstmark, 2010).

An infusion is a beverage obtained from aerial parts (dried leaves, flowers and fruits) from several herbs or aromatic plants to which water near boiling point is added and let rest during some time (Wiseman *et al.*, 1997). In the last years, consumption of this kind of beverages has increased considerably among Mexican population (Rivera *et al.*, 2008),

Una infusión es una bebida que se obtiene de las partes aéreas (hojas secas, flores y frutos) de varias hierbas o plantas aromáticas a las cuales se vierte agua a punto de hervir y se deja reposar durante un tiempo (Wiseman *et al.*, 1997). En los últimos años, el consumo de este tipo de bebidas se ha incrementado considerablemente entre la población mexicana (Rivera *et al.*, 2008), destacando las infusiones preparadas con manzanilla (*Matricaria chamomilla* L.), limón (*Cymbopogon citratus*), hierbabuena (*Mentha piperita* L.), árnica (*Heterotheca inuloides*) y boldo (*Peumus boldus* Molina). La preferencia en el consumo de estas hierbas se atribuye a su sabor agradable, mientras que adicionalmente proveen efectos benéficos a la salud, entre los que se encuentran la actividad antimicrobiana, capacidad antioxidante y actividad antiinflamatoria aguda, entre otros, los cuales se han relacionado a su contenido de compuestos fenólicos (McKay y Blumberg, 2006; Wiart, 2007; Pereira *et al.*, 2009).

Debido a la importancia del consumo de estas infusiones por la población mexicana, quienes están en la búsqueda de beneficios para su salud, existe actualmente un gran número de marcas comerciales disponibles en el mercado. Sin embargo, estas hierbas se cultivan en diversas regiones (ecofisiología), lo que afecta el contenido de polifenoles, entre otros compuestos. Debido a que la cantidad de polifenoles en el té se considera como un indicador de calidad del mismo, el objetivo de este estudio fue comparar el contenido de compuestos fenólicos (fenoles totales y flavonoides totales), la capacidad antioxidante (evaluada por los métodos ABTS, FRAP y actividad quelante) y la actividad antiinflamatoria (inhibición de la enzima COX-2) de las infusiones comercialmente disponibles de manzanilla, limón, hierbabuena, árnica y boldo, con el propósito de identificar algunas de las marcas y tipos de infusiones con mayor beneficio para los consumidores(as) en México.

## Materiales y métodos

### Materiales

**Material biológico:** las bolsas de té se obtuvieron de las cuatro principales compañías comercializadoras (marcas A-D) en los supermercados locales en el año de 2009. Las hierbas de estudio fueron: manzanilla (*Matricaria chamomilla* L.) marcas A-D, limón (*Cymbopogon citratus*) marcas A-D, hierbabuena (*Mentha piperita* L.) marcas A-D, árnica (*Heterotheca inuloides*) marca A y boldo (*Peumus*

outstanding infusions prepared with chamomile (*Matricaria chamomilla* L.), lemon grass (*Cymbopogon citratus*), peppermint (*Mentha piperita* L.), arnica (*Heterotheca inuloides*) and boldo (*Peumus boldus* Molina). The preference of consumption in these herbs is attributable to their pleasant taste, while additionally they supply beneficial effects on health, among them are anti-microbial activity, antioxidant capacity and acute anti-inflammatory activity, among others, which are related to their phenolic compounds content (McKay and Blumberg, 2006; Wiart, 2007; Pereira *et al.*, 2009).

Due importance of consumption of these infusions by Mexican population, who are searching health benefits, there is actually huge number of commercial brands available in the market. However, these herbs are harvested in several regions (ecophysiology), which affects polyphenols content, among other compounds. Due the amount of phenols in tea is considered quality indicator, the aim of this study was to compare phenolic compounds content (total phenols and total flavonoids), the antioxidant capacity (assessed by ABTS, FRAP methods and chelant activity) and the anti-inflammatory activity (inhibition of COX-2 enzyme) of commercially available infusions of chamomile, lemon grass, peppermint, arnica and boldo, with the purpose to identify some infusion brands and types with better benefit for consumers in Mexico.

## Materials and methods

### Materials

**Biological material:** tea bags were obtained from the four main marketing companies (brands A-D) in local supermarkets in year 2009. Herbs in study were: chamomile (*Matricaria chamomilla* L.) brands A-D, lemon grass (*Cymbopogon citratus*) brands A-D, peppermint (*Mentha piperita* L.) brands A-D, arnica (*Heterotheca inuloides*) brands A, and boldo (*Peumus boldus* Molina) brand A. With comparative ends a sample of green tea (*Camellia sinensis* L. Kuntze) was included from commercial brand B. For all samples total weight of bag and lot numbers were recorded. Infusions were prepared adding 200 mL of distilled water near at boiling point to each tea bag (adjusting volume of 1 g of tea material), which let rest for 10 minutes protected from light with aluminum paper and with slight stirring every 2 minutes; tea bags were removed and infusions were cooled at ambient temperature. Immediately after

*boldus* Molina) marca A. con fines comparativos, se incluyó una muestra de té verde (*Camellia sinensis* L. Kuntze) de la marca comercial B. Para todas las muestras se registró el peso total de cada bolsita y los números de lote. Las infusiones se prepararon añadiendo 200 mL de agua destilada a punto de hervir a cada bolsa de té (ajustando el volumen a 1 g de material de té), las cuales se dejaron reposar durante 10 minutos protegidas de la luz con papel aluminio y con una agitación ligera cada 2 min; se retiraron las bolsas de té y las infusiones se enfriaron a temperatura ambiente. Inmediatamente después se determinó el contenido de fenoles y flavonoides totales, así como las propiedades antiinflamatorias y antioxidantes. Para el análisis de HPLC, las infusiones se liofilizaron previamente.

## Métodos

**Determinación de fenoles y flavonoides totales.** El contenido de fenoles totales de las infusiones se determinó por el método de Folin-Ciocalteu (Dewanto *et al.*, 2002), empleando diluciones apropiadas de cada infusión. La absorbancia de las muestras se midió a 760 nm en un lector de microplacas modelo Spectra Max (marca Molecular Devices Co., Sunnyvale, CA, EUA). Los resultados se expresaron como  $\mu\text{g}$  equivalentes de ácido gálico (AG) por mL ( $\mu\text{g}$  eq. AG/mL). El contenido total de flavonoides se determinó por el método descrito por Liu *et al.* (2002), empleando diluciones adecuadas de cada infusión. La absorbancia de las muestras se midió a 510 nm en un lector de microplacas; incluyéndose además un blanco. Los resultados se expresaron como  $\mu\text{g}$  equivalentes de (+)-catequina por mL de infusión ( $\mu\text{g}$  eq. (+)-catequina/mL). Los análisis se realizaron por triplicado y los datos se reportaron como la media  $\pm$  el error estándar de la media (EE).

**Identificación y cuantificación de compuestos fenólicos por HPLC.** Debido a la dificultad para identificar los compuestos fenólicos directamente, se procedió primero a concentrar las infusiones por liofilización, para posteriormente disolverlas en metanol y filtrarlas a través de una membrana con poro de 0.2  $\mu\text{m}$ . Para la separación de los compuestos se inyectaron 20  $\mu\text{L}$  de cada muestra, por triplicado, a una columna de fase reversa (Prep-Nova Pack HR-C19, 60A, 6  $\mu\text{m}$ , 300 x 3.9 mm) empleando un sistema de HPLC (Waters Corporation, Milford, MA, EUA), el cual consistió de una bomba cuaternaria (modelo 600), un detector de arreglos de fotodiodos (modelo 996) y un inyector manual modelo Rheodyne (7725i). Tanto el control de las condiciones y manejo del equipo, como la

total phenols and flavonoids content was calculated, as well as anti-inflammatory and antioxidant properties. For HPLC analysis, lyophilization was previously applied to infusions.

## Methods

**Determination of total phenols and flavonoids.** Total phenols content in infusions was determined by Folin-Ciocalteu method (Dewanto *et al.*, 2002), using proper dilutions of each infusion. Absorbance of samples was measured at 760 nm in Spectra Max model microplate reader (brand Molecular Devices Co., Sunnyvale, CA, EUA). Results were expressed like  $\mu\text{g}$  equivalent of de gallic acid (AG) per mL ( $\mu\text{g}$  eq. AG/mL). Total flavonoids content was determined by method described by Liu *et al.* (2002), using proper dilutions of each infusion. Absorbance of samples was measured at 510 nm in microplate reader; including besides a target. Results were expressed like  $\mu\text{g}$  equivalent of (+)-catechin per mL of infusion ( $\mu\text{g}$  eq. (+)-catechin/mL). The analyses were made by triplicate and the data were reported like mean  $\pm$  mean's standard deviation (SD).

**Identification and quantification of phenolic compounds by HPLC.** Due to complexity to directly identify phenolic compounds, it proceeded first to make the infusions more concentrated by means of lyophilization, to then dissolve them in methanol and filter them through strain with 0.2 mm mesh. For segregating the compounds 20  $\mu\text{L}$  of each sample, in triplicate, to reverse phase column (Prep-Nova Pack HR-C19, 60A, 6  $\mu\text{m}$ , 300 x 3.9 mm) were added using HPLC system (Waters Corporation, Milford, MA, EUA), which consisted in one quaternary pump (model 600) and manual injector model Rheodyne (7725i). As well conditions control and equipment handling, as data acquisition and processing was made by software Empower (Waters). Mobile phase consisted in solvent A (acetonitrile) and solvent B (acetic acid 0.0125 N) using flow of 1 mL/min. The elution of compounds was made under isocratic conditions up to min 27: from 0 to 2 min with 10% A and 90% B; from min 2 to 7 with 20% A and 80% B; from min 7 to 27 with 50% A and 50% B; subsequently, gradient was applied from min 27 to 30 starting with 50% A and finishing with 5% A.

**Method ABTS.** Determination of antioxidant capacity equivalent in Trolox (TEAC) was assessed using method of 2,2'-azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulphonic acid) or ABTS described by Nenadis *et al.*, (2004). The method was modified to be adapted to 96 holes microplates (Nalge



adquisición y procesamiento de los datos se realizó a través del software Empower (Waters). La fase móvil consistió en el solvente A (acetonitrilo) y el solvente B (ácido acético 0.0125 N), empleándose un flujo de 1 mL/min. La elución de los compuestos se realizó bajo condiciones isocráticas hasta el min 27: de 0 a 2 min con 10% A y 90% B; del min 2 al 7 con 20% A y 80% B; del min 7 al 27 con 50% A y 50% B; posteriormente, se aplicó un gradiente desde el min 27 al 30 comenzando con 50% A y terminando con 5% A.

**Método ABTS.** La determinación de la capacidad antioxidante equivalente en Trolox (TEAC) se evaluó utilizando el método del ácido 2,2'-azino-bis (3-etilbenzotiazolina-6-sulfónico) (ABTS, por sus siglas en inglés) descrito por Nenadis *et al.*, (2004). El método se modificó para ser adaptado a microplacas de 96 pozos (Nalge Nunc International, NY, EUA). Los controles incluyeron todos los reactivos excepto la infusión o el reactivo de Trolox. La absorbancia se registró a los 0 y 6 min de reacción en un lector de microplacas modelo SpectraMax a una longitud de onda de 730 nm. El porcentaje de inhibición de la absorbancia se calculó de acuerdo a la ecuación (1).

$$\text{Inhibición (\%)} = 100 \times (1 - A_{\text{muestra}}/A_{\text{control}}) \quad (1)$$

Donde:  $A_{\text{muestra}}$  es la absorbancia de la muestra y  $A_{\text{control}}$  es la absorbancia del control (sin antioxidante).

**Método FRAP.** La capacidad antioxidante por el ensayo del poder reductor férrico (FRAP, por sus siglas en inglés) se realizó de acuerdo a la metodología descrita por Firuzi *et al.* (2005), usando sulfato ferroso ( $\text{FeSO}_4$ ) como estándar y modificado para realizarse en microplacas de 96 pozos. Se incluyó un control con metanol y la absorbancia se midió a 595 nm en un lector de microplacas modelo SpectraMax. Los datos se analizaron mediante el software SoftMax Pro (Molecular Devices, LLC, CA, EUA) y los resultados se expresaron como  $\mu\text{g}$  equivalente de sulfato ferroso por mL de infusión ( $\mu\text{g eq. FeSO}_4/\text{mL}$ ). Los análisis se realizaron por triplicado y los datos se reportaron como la media  $\pm$  EE.

**Actividad quelante.** La actividad quelante del ion  $\text{Fe}^{2+}$  se realizó por el método descrito por Hinneburg *et al.* (2006), adaptado a microplacas de 96 pozos. La absorbancia de la muestras de reacción se midió a 562 nm y la actividad quelante del ion  $\text{Fe}^{2+}$  se calculó de acuerdo a la ecuación (1), expresándose como  $\mu\text{g}$  equivalentes de EDTA por mL ( $\mu\text{g eq EDTA}/\text{mL}$ ). Los análisis se realizaron por triplicado y los datos se reportaron como la media  $\pm$  EE.

Nunc International, NY, EUA). Controls included all reagents except infusion or Trolox reagent. Absorbance was recorded at 0 and 6 min of reaction with microplate reader model Spectra Max at a wavelength of 730 nm. Percentage of inhibition of absorbance was calculated according to equation (1).

$$\text{Inhibition (\%)} = 100 \times (1 - A_{\text{sample}}/A_{\text{control}}) \quad (1)$$

Where:  $A_{\text{sample}}$  is the absorbance of the sample and  $A_{\text{control}}$  is the absorbance of the control (no antioxidant).

**FRAP method.** Antioxidant capacity determined by ferric ion reducing antioxidant power (FRAP) was made according to methodology described by Firuzi *et al.*, (2005), using iron (II) sulfate ( $\text{FeSO}_4$ ) like standard and modified for using it in 96 holes microplates. Control with methanol was included and absorbance was measured at 595 nm in SpectraMax microplate model. Data were analyzed by software SoftMax Pro (Molecular Devices, LLC, CA, USA) and results were expressed like  $\mu\text{g}$  equivalent of iron (II) sulfate per mL of infusion ( $\mu\text{g eq. FeSO}_4/\text{mL}$ ). Analysis were made by triplicate and data were reported like mean  $\pm$  SE.

**Chelant activity.** Chelant activity of  $\text{Fe}^{2+}$  ion was made by method described by Hinneburg *et al.*, (2006), adapted to 96 holes microplates. Absorbance of reaction samples was measured at 562 nm and chelant activity of  $\text{Fe}^{2+}$  ion was calculated according to equation (1), expressed like  $\mu\text{g}$  equivalent of EDTA per mL ( $\mu\text{g eq EDTA}/\text{mL}$ ). The analyses were made by triplicate and data were reported like mean  $\pm$  SE.

**Determination of inhibition percentage of COX-2 enzyme.** The anti-inflammatory activity of infusions was determined using a commercial kit of COX-2 inhibition (Cayman Chemical Company, Ann Arbor, MI, USA). The results were processed according to software EIA version Triple 2008D235 supplied by company Cayman ([www.caymanchem.com/analysis/eia](http://www.caymanchem.com/analysis/eia)) and were expressed like inhibition percentage (%).

**Statistical analysis.** Experimental values are shown like mean of data  $\pm$  mean's standard error (SE) of analysis by triplicate. For all determinations, data were analyzed by ANOVA method in one way with significant level  $p < 0.05$ , followed by means comparison using Tukey test. Analyses were processed with statistical software JMP V 5.0.1 (SAS Institute Inc., Cary, NC, USA).

**Determinación del porcentaje de inhibición de la enzima COX-2.** La actividad antiinflamatoria de las infusiones se determinó empleando un kit comercial de inhibición de COX-2 (Cayman Chemical Company, Ann Arbor, MI, EUA). Los resultados se procesaron de acuerdo al programa EIA versión Triple 2008D235 proporcionado por la compañía Cayman ([www.caymanchem.com/analysis/eia](http://www.caymanchem.com/analysis/eia)) y se expresaron como porcentaje de inhibición (%) inhibición.

**Análisis estadístico.** Los valores experimentales se muestran como la media de los datos  $\pm$  el error estándar de la media (EE) de un análisis por triplicado. Para todas las determinaciones, los datos se analizaron por el método ANOVA de una sola vía con un nivel de significancia  $p < 0.05$ , seguido de comparación de medias usando la prueba de Tukey. Los análisis se procesaron en el paquete estadístico JMP V 5.0.1 (SAS Institute Inc., Cary, NC, EUA).

## Resultados

### Contenido de fenoles totales y flavonoides en las infusiones comerciales

Los compuestos fenólicos son los metabolitos secundarios más abundantes en las plantas y poseen diversas actividades biológicas, como la capacidad antioxidante y antiinflamatoria (Halliwell *et al.*, 2005; Wiart, 2007; Carlsen *et al.*, 2010); por lo anterior, se llevó a cabo la determinación del contenido de fenoles totales y flavonoides en las infusiones bajo estudio (Cuadro 1).

El contenido de fenoles totales osciló entre 61.84 a 1628.05  $\mu\text{g eq. AG/mL}$ , con un orden de ascendencia: manzanilla = limón < árnica < hierbabuena < boldo < té verde. El contenido de flavonoides también varió dentro de un intervalo de 44.36 a 426.30  $\mu\text{g eq. (+)-catequina/mL}$ , con un orden de ascendencia similar al contenido de fenoles totales: manzanilla = limón < árnica < hierbabuena < té verde < boldo. En cuanto a las muestras de manzanilla y limón no se observaron diferencias estadísticas en los contenidos de fenoles totales y flavonoides entre las marcas comerciales A - D; mientras que, la marca A de hierbabuena mostró un mayor contenido de fenoles y flavonoides comparada con las otras marcas comerciales B - D. Los resultados para las infusiones de manzanilla y hierbabuena son similares a lo informado por Guzmán *et al.* (2005), quienes reportan valores de 70 y 250  $\mu\text{g eq. AG/mL}$ , respectivamente. Sin embargo, la variación en el contenido de

## Results

### Total and flavonoids phenols content in commercial infusions

The phenolic compounds are the most abundant secondary metabolites in plants and have several biological activities, like antioxidant and anti-inflammatory capacity (Halliwell *et al.*, 2005; Wiart, 2007; Carlsen *et al.*, 2010); by this reason, determination of total and flavonoids phenols content in the studied infusions was performed (Table 1).

### Cuadro 1. Contenido de fenoles totales y flavonoides en las infusiones comerciales.

**Table 1. Total phenols and flavonoids content in commercial infusions.**

Infusión	Marca comercial	Fenoles totales $\mu\text{g eq. AG/mL}$	Flavonoides totales $\mu\text{g eq. (+)-catechin/mL}$
Manzanilla	Marca A	69.28 $\pm$ 0.75 <sup>f</sup>	46.18 $\pm$ 2.69 <sup>e</sup>
	Marca B	61.84 $\pm$ 2.79 <sup>f</sup>	61.35 $\pm$ 3.34 <sup>e</sup>
	Marca C	62.61 $\pm$ 0.74 <sup>f</sup>	44.36 $\pm$ 1.82 <sup>e</sup>
	Marca D	66.72 $\pm$ 0.79 <sup>f</sup>	51.48 $\pm$ 2.35 <sup>e</sup>
Limón	Marca A	71.69 $\pm$ 1.07 <sup>f</sup>	48.31 $\pm$ 5.85 <sup>e</sup>
	Marca B	69.91 $\pm$ 2.00 <sup>f</sup>	68.39 $\pm$ 2.23 <sup>e</sup>
	Marca C	72.66 $\pm$ 1.32 <sup>f</sup>	74.37 $\pm$ 3.80 <sup>e</sup>
	Marca D	75.66 $\pm$ 1.20 <sup>f</sup>	59.42 $\pm$ 5.01 <sup>e</sup>
Hierbabuena	Marca A	231.85 $\pm$ 4.17 <sup>c</sup>	321.39 $\pm$ 9.71 <sup>b</sup>
	Marca B	150.80 $\pm$ 10.37 <sup>e</sup>	182.64 $\pm$ 15.62 <sup>d</sup>
	Marca C	203.85 $\pm$ 4.07 <sup>d</sup>	253.86 $\pm$ 5.67 <sup>c</sup>
	Marca D	201.93 $\pm$ 1.48 <sup>d</sup>	255.36 $\pm$ 1.51 <sup>c</sup>
Árnica	Marca A	173.31 $\pm$ 1.87 <sup>c</sup>	227.37 $\pm$ 8.48 <sup>c</sup>
Boldo	Marca A	312.71 $\pm$ 4.44 <sup>b</sup>	426.30 $\pm$ 20.00 <sup>a</sup>
Té verde*	Marca B	1628.05 $\pm$ 18.17 <sup>a</sup>	320.53 $\pm$ 5.19 <sup>b</sup>

Los resultados son el promedio de 3 experimentos independientes con réplicas por triplicado  $\pm$  EE. <sup>a,b,c,d,e,f</sup> valores con letra diferente dentro de cada columna indican diferencia estadística significativa ( $p < 0.05$ ). AG= ácido gálico. \*La infusión de té verde se incluyó para fines comparativos.

fenoles entre las 4 marcas de hierbabuena se puede atribuir a variabilidad genética de las plantas, la composición del suelo, el clima, el método de cosecha, almacenamiento poscosecha, así como al muestreo y las prácticas de elaboración (Friedman *et al.*, 2009). De forma similar, Moraes de Souza *et al.*, (2008) encontraron un orden de compuestos fenólicos para algunas de las infusiones evaluadas en el presente estudio (manzanilla < hierbabuena < té verde).

### Capacidad antioxidante

En el presente estudio se emplearon los ensayos *in vitro* ABTS y FRAP para evaluar la capacidad antioxidante de las infusiones a través de la actividad quelante sobre radicales libres y el poder reductor total, respectivamente. Los resultados indicaron que todas las infusiones tuvieron la capacidad de barrido del radical monocatión ABTS y los valores de TEAC se muestran en el Cuadro 2. Aunque existe un amplio intervalo de variación entre los datos (0.55 - 4.90  $\mu\text{mol eq. Tx/mL}$ ), las infusiones de té verde y boldo mostraron la mejor actividad antirradical, seguida de las cuatro marcas de hierbabuena; mientras que, las infusiones de limón y manzanilla mostraron la actividad antirradical mas baja, sin diferencia significativa entre las diferentes marcas evaluadas.

Total phenols content ranged between 61.84 and 1628.05  $\mu\text{g eq. AG/mL}$ , in ascending order as follows: chamomile= lemon grass < arnica < peppermint < boldo < green tea. Flavonoids content also had an interval from 44.36 to 426.30  $\mu\text{g eq. (+)-catechin/mL}$ , with an ascending order similar to the one of total phenols content: chamomile= lemon grass < arnica < peppermint < green tea < boldo. As for chamomile and lemon samples there were no detected statistical differences in total and flavonoids phenols content between commercial brands A - D; while brand A of chamomile showed higher content of phenols and flavonoids than compared with other commercial brands B - D. Results for chamomile and peppermint infusions are similar to informed by Guzmán *et al.* (2005), who reported values between 70 and 250  $\mu\text{g eq. AG/mL}$ , respectively. However, variation in phenols content between 4 peppermint brands can be attributable to the genetic variability of plants, soil composition, climate, harvest method, post-harvest storage, as well as sampling and fabrication practices (Friedman *et al.*, 2009). Similarly, Moraes de Souza *et al.* (2008) found an order for phenolic compounds for some of the infusions assessed herein (chamomile < peppermint < green tea).

**Cuadro 2. Capacidad antioxidante de infusiones comerciales.**  
**Table 2. Antioxidant capacity of commercial infusions.**

Infusión	Marca comercial	ABTS	FRAP	Actividad quelante
		$\mu\text{mol eq. Tx/mL}$	$\mu\text{mol eq. FeSO}_4/\text{mL}$	$\mu\text{g eq. EDTA/mL}$
Manzanilla	Marca A	0.55 $\pm$ 0.010 <sup>f</sup>	1.33 $\pm$ 0.007 <sup>fg</sup>	135.71 $\pm$ 1.87 <sup>a</sup>
	Marca B	0.52 $\pm$ 0.020 <sup>f</sup>	1.37 $\pm$ 0.003 <sup>f</sup>	119.43 $\pm$ 1.35 <sup>c</sup>
	Marca C	0.60 $\pm$ 0.010 <sup>f</sup>	1.11 $\pm$ 0.008 <sup>h</sup>	110.64 $\pm$ 1.02 <sup>d</sup>
	Marca D	0.57 $\pm$ 0.010 <sup>f</sup>	1.12 $\pm$ 0.003 <sup>h</sup>	100.56 $\pm$ 1.29 <sup>c</sup>
Limón	Marca A	0.63 $\pm$ 0.009 <sup>f</sup>	1.25 $\pm$ 0.006 <sup>g</sup>	29.52 $\pm$ 0.59 <sup>j</sup>
	Marca B	0.69 $\pm$ 0.010 <sup>f</sup>	1.08 $\pm$ 0.008 <sup>h</sup>	27.20 $\pm$ 0.97 <sup>j</sup>
	Marca C	0.63 $\pm$ 0.003 <sup>f</sup>	0.86 $\pm$ 0.006 <sup>i</sup>	20.15 $\pm$ 1.70 <sup>k</sup>
	Marca D	0.70 $\pm$ 0.006 <sup>f</sup>	1.26 $\pm$ 0.006 <sup>g</sup>	28.36 $\pm$ 0.99 <sup>j</sup>
Hierbabuena	Marca A	2.04 $\pm$ 0.070 <sup>c</sup>	5.39 $\pm$ 0.017 <sup>c</sup>	127.59 $\pm$ 1.40 <sup>b</sup>
	Marca B	1.28 $\pm$ 0.060 <sup>c</sup>	3.69 $\pm$ 0.019 <sup>d</sup>	74.03 $\pm$ 2.02 <sup>g</sup>
	Marca C	1.55 $\pm$ 0.020 <sup>de</sup>	3.59 $\pm$ 0.013 <sup>c</sup>	83.44 $\pm$ 0.58 <sup>f</sup>
	Marca D	1.72 $\pm$ 0.050 <sup>d</sup>	5.57 $\pm$ 0.016 <sup>b</sup>	112.76 $\pm$ 1.02 <sup>cd</sup>
Árnica	Marca A	1.47 $\pm$ 0.010 <sup>de</sup>	1.32 $\pm$ 0.006 <sup>fg</sup>	72.21 $\pm$ 1.19 <sup>gh</sup>
Boldo	Marca A	3.61 $\pm$ 0.100 <sup>b</sup>	1.28 $\pm$ 0.004 <sup>fg</sup>	85.15 $\pm$ 1.56 <sup>f</sup>
Té verde*	Marca B	4.90 $\pm$ 0.180 <sup>a</sup>	14.10 $\pm$ 0.058 <sup>a</sup>	66.66 $\pm$ 2.23 <sup>h</sup>

Los resultados son el promedio de 3 experimentos independientes con réplicas por triplicado  $\pm$  EE. <sup>a,h,c,d,e,f,g,h</sup> valores con letra diferente dentro de cada columna indican diferencia estadística significativa ( $p < 0.05$ ). Tx= Trolox. \*La infusión de té verde se incluyó para fines comparativos.

En cuanto a los valores del poder reductor total, como una alternativa de ensayo para evaluar la actividad antioxidante total de las infusiones (Benzie y Szeto, 1999), los datos indican una variación significativa entre la capacidad de cada infusión para reducir el ion  $\text{Fe}^{3+}$  a  $\text{Fe}^{2+}$ , con valores de FRAP que oscilaron entre 0.86 a 14.1  $\mu\text{mol eq. FeSO}_4/\text{mL}$ . En general, las infusiones de hierbabuena mostraron la mayor actividad antioxidante, con diferencias significativas entre las marcas comerciales A - D.

Se ha sugerido que la capacidad antioxidante de los compuestos fenólicos, así como de los flavonoides, también se puede llevar a cabo a través de la quelación de iones metálicos de transición que participan en la producción de radicales libres (Mira *et al.*, 2002). Por lo tanto, las propiedades de quelación de las infusiones se determinaron por el ensayo de quelación del ion  $\text{Fe}^{2+}$  y los resultados se muestran en el Cuadro 2. Las infusiones de manzanilla mostraron la mayor actividad quelante, seguidas de las infusiones de hierbabuena; en ambos casos con diferencia significativa entre las cuatro marcas evaluadas. Por el contrario, las infusiones de limón mostraron la menor actividad antioxidante, sin diferencia significativa entre las marcas comerciales, excepto la marca C.

En base al análisis de correlación, la capacidad antioxidante medida por el método de ABTS mostró una correlación significativa con el contenido fenoles ( $p < 0.001$ ,  $r = 0.866$ ) y flavonoides totales ( $p < 0.001$ ,  $r = 0.852$ ); mientras que los valores de FRAP se relacionaron únicamente con el contenido de fenoles totales ( $p < 0.001$ ,  $r = 0.921$ ); encontrándose, por lo tanto, una correlación significativa entre ambos métodos antioxidantes ( $p < 0.001$ ,  $r = 0.788$ ). Por el contrario, la actividad quelante no mostró correlación significativa ni con el contenido de fenoles ni con el contenido de flavonoides totales ( $p > 0.05$ ).

En general, los resultados indican que las infusiones muestran varios grados de eficacia o capacidad antioxidante para cada ensayo. Si bien estos ensayos valoran la capacidad de transferencia electrónica, el pH bajo el cual se realizan las mediciones es diferente, el ensayo FRAP requiere de un pH ácido, mientras que el ensayo de ABTS se realiza a un pH cercano al neutro. Al incrementarse el pH del medio, los grupos ionizables donan radicales hidrógeno a un determinado valor de  $pK_a$ , e implícitamente permiten la transferencia de electrones más fácilmente (Herrero-Martínez *et al.*, 2005). De manera adicional, se evaluó la capacidad de las infusiones para quelar los iones  $\text{Fe}^{2+}$ , lo cual depende de las interacciones intermoleculares entre el ión

## Antioxidant capacity

In this study *in vitro* ABTS and FRAP tests were used to assess antioxidant capacity of infusions through chelant activity on free radicals and total reducing power, respectively. The results indicate that all infusions had capacity of swapping ABTS radical monocation and TEAC values are shown in Table 2. Although there is a wide variation interval between data (0.55 - 4.90  $\mu\text{mol eq. Tx/mL}$ ), green tea and boldo infusions showed better antiradical activity, followed by four brands of peppermint; while lemon and chamomile infusions showed the lowest antiradical activity, without significant differences between the assessed brands.

As for values of total reducing power, like alternative to test for assessing total antioxidant activity of infusions (Benzie and Szeto, 1999), data show significant variation between capacity of each infusion to reduce  $\text{Fe}^{3+}$  ion to  $\text{Fe}^{2+}$ , with FRAP values that ranged between 0.86 to 14.1  $\mu\text{mol eq. FeSO}_4/\text{mL}$ . In general, peppermint infusions showed higher antioxidant activity, with significant differences between commercial brands A - D.

It has been suggested that antioxidant capacity of phenolic compounds, as well as flavonoids, can also be made through chelation of metallic transition ions that participate in generating free radicals (Mira *et al.*, 2002). Therefore, chelation properties of infusions were defined by test of chelation of ion  $\text{Fe}^{2+}$  and the results are shown in Table 2. Chamomile infusions showed higher chelant activity, followed by peppermint infusions; in both cases with significant difference between four brands. On the other hand, lemon infusions showed lowest antioxidant activity, with no significant difference between commercial brands, except C.

Based on correlation analysis, antioxidant capacity measured by ABTS method showed a significant correlation with phenols content ( $p < 0.001$ ,  $r = 0.866$ ) and total flavonoids ( $p < 0.001$ ,  $r = 0.852$ ); while FRAP values were only related with total phenols content ( $p < 0.001$ ,  $r = 0.921$ ); finding a significant correlation between both antioxidant methods ( $p < 0.001$ ,  $r = 0.788$ ). On the other hand, chelant activity did not show significant correlation either phenols content nor total flavonoids content ( $p > 0.05$ ).

In general, results indicate that infusions show several levels of efficacy or antioxidant capacity for each test. Although these tests proved electronic transference capacity, pH



y los metabolitos secundarios contenidos en las infusiones (Mira *et al.*, 2002). Otros factores que contribuyen a la diferencia observada entre los ensayos es el uso de diferentes estándares y la reactividad del mono catión radical ABTS<sup>+</sup>. Asimismo, el método FRAP evalúa la capacidad de diversos compuestos, como los flavonoides, de atrapar el radical u oxidante, debido principalmente a la presencia de un grupo catecol en el anillo B del flavonoide, un grupo hidroxilo en el anillo C y una doble ligadura en los carbonos 2, 3 del anillo C.

En este sentido, las infusiones comerciales de hierbabuena muestran las mejores propiedades antioxidantes a través de las tres técnicas empleadas en el presente estudio, con los valores más altos obtenidos para la marca A. Las variaciones entre las marcas de hierbabuena podría atribuirse a las diferentes especies de *Mentha* que se emplean comercialmente, las más usadas son *Mentha viridis*, *Mentha piperita* y *Mentha spicata*, esta última denominada “menta nativa” y las dos primeras especies son el resultado de proceso de hibridación, por lo que se puede suponer que las variaciones en la capacidad antioxidante se deben a manipulaciones genéticas, las cuales se enfocan principalmente en intereses agronómicos (resistencia a herbicidas y patógenos) (Jullien, 2007).

### Caracterización de compuestos fenólicos por HPLC

En la Figura 1 se muestran cromatogramas representativos de las infusiones comerciales de hierbabuena y té verde, con sus respectivos estándares. En las infusiones de manzanilla de las marcas D y C se identificaron el ácido cafeico, umbeliferona, apigenina y herniarina; mientras que para las marcas A y B, la quercetina también estuvo presente, además de los compuestos encontrados en las marcas D y C; sin embargo, hay que destacar que la mayoría de estos compuestos se encontraron en cantidades traza (Cuadro 3). La ausencia de quercetina en las infusiones de manzanilla de las marcas D y C pudo deberse al proceso al que son sometidas para su comercialización y durante la elaboración de la infusión. Crozier *et al.* (1997) reportan una pérdida de 75- 80% en el contenido de quercetina después ebulir muestras de cebolla y jitomate por 15 min. Por otro lado, los compuestos eriocitrina, hesperidina y ácido rosmarínico se identificaron en todas las marcas de hierbabuena (Figura 1), siendo el ácido rosmarínico el mayor constituyente (Cuadro 3). Estos resultados coinciden con los de Fecka y Turek (2007), quienes reportaron a la eriocitrina, el ácido rosmarínico y los derivados del ácido cafeico (dímero de cafeato), como los principales compuestos en la infusión de hierbabuena;

under which measurements are made is different, FRAP test requires acid pH, while ABTS test is made with pH near to neutral. When pH of medium is increased, ionizable groups donate hydrogen radicals at a given pka value, and it is implicit that allow electron transference more easily (Herrero-Martínez *et al.*, 2005). Also, the capacity of infusions to make chelation on Fe<sup>2+</sup> ions was tested, which depends on intermolecular interactions between ion and secondary metabolites contained in infusions (Mira *et al.*, 2002). Other factor that contribute to detected difference in tests is the use of different standards and the reactivity of radical mono cation ABTS<sup>+</sup>. Also, FRAP method assesses the capacity of several compounds, like flavonoids, of catching the radical or oxidant, due mainly to presence of catechol group in ring B of flavonoid, an hydroxyl group in C ring and double bond in carbons 2, 3 of C ring.

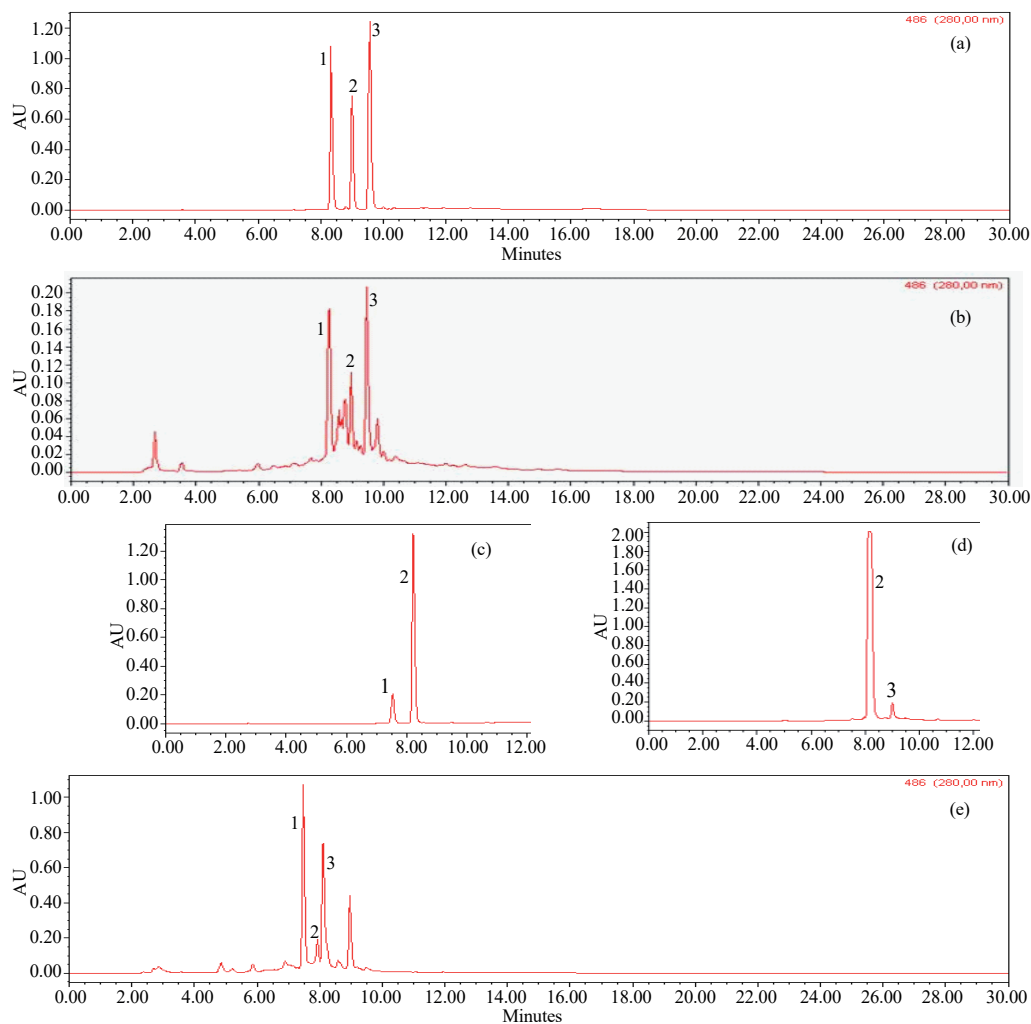
In this sense, commercial infusions of peppermint show the best antioxidant properties through three used techniques in this study, with highest values obtained for brand A. Variations between peppermint brands could be due to different species of *Mentha* that are commercially used, the most used are *Mentha viridis*, *Mentha piperita* and *Mentha spicata*, this last called “native mint” and the two first species are result of hybridation process, then is reasonable to say that variations in antioxidant capacity is due genetic manipulation, which are focused mainly in agronomical interests (resistance to herbicides and pathogens) (Jullien, 2007).

### Characterization of phenolic compounds by HPLC

In Figure 1 is shown the representative chromatograms of commercial infusions of peppermint and green tea, with their corresponding standards. In chamomile infusions of brands D and C are identified the caffeic acid, umbelliferone, apigenin and herniarin; while for brands A and B, the quercetin was also detected, besides of compound found in brands D and C; however, it is important to mention that most of these compounds are found in trace quantities (Table 3). The absence of quercetin in chamomile infusions of brands D and C could be due the process they are subject for their commercialization and during elaboration of infusion. Crozier *et al.* (1997) report loss of 75- 80% in content of quercetin after boiling samples of onion and tomato during 15 min. On the other hand, the compounds eriocitrin, hesperidin and rosmarinic acid are detected in peppermint brands (Figure 1), being rosmarinic acid the main constituent (Table 3).

sin embargo, la concentración de estos compuestos son superiores a los encontrados en este estudio (18.9 mg/g de eriocitrina, 5.3 mg/g de ácido rosmarínico y 1.7 mg/g de hesperidina). De manera similar, en un extracto acuoso (Ex) obtenido de las hojas de hierbabuena (*Mentha x piperitae* folium) se identificaron compuestos fenólicos como la eriocitrina, luteolina-7-O-rutinosida, diosmina, hesperidina, narirutina, isoroifolina, ácido rosmarínico y ácido cafeico; donde el contenido de polifenoles en el Ex fue: eriocitrina 38%, luteolina-7-O-rutinosida 3.5%, hesperidina 2.9%, diosmina 0.8%, isoroifolina 0.6%, narirutina 0.3%, ácido rosmarínico 3.7% y ácido cafeico 0.05% (Sroka *et al.*, 2005).

These results coincide with the results from Fecka and Turek (2007), who reported that eriocitrin, rosmarinic acid and byproducts of caffeic acid (caffeate dimer) are the main compounds in peppermint infusion; however, the concentration of these compounds are superior to the ones found in this study (18.9 mg/g of eriocitrin, 5.3 mg/g of rosmarinic acid and 1.7 mg/g of hesperidin). In the same way, in an aqueous extract (Ex) obtained from peppermint leaves (*Mentha x piperitae* folium) phenolic compounds like eriocitrin, luteolin-7-O-rutinoside, diosmin, hesperidin, narirutin, isoroifolin, rosmarinic acid and caffeic acid were identified; in which polyphenols content in Ex was: eriocitrin



**Figura 1. Cromatogramas representativos de infusiones herbales concentradas. a) mezcla de estándares para las muestras de hierbabuena (1 eriocitrina, 2 hesperidina, 3 ácido rosmarínico); b) infusión de hierbabuena de la marca comercial A. c y d) mezcla de estándares para la muestra de té verde (1 catequina, 2 ácido cafeico, 3 EGCG); y e) Infusión de té verde de la marca comercial B.**

**Figure 1. Chromatograms representing herbal infusions in concentration. a) mixture of standards for samples of peppermint (1 eriocitrin, 2 hesperidin, 3 rosmarinic acid); b) peppermint infusion of commercial brand A. c and d) mixture of standards for sample of green tea (1 catechin, 2 caffeic acid, 3 EGCG); and e) infusion of green tea of commercial brand B.**

**Cuadro 3. Cuantificación de compuestos fenólicos presentes en infusiones por HPLC.**  
**Table 3. Quantification of phenolic compounds that exist in infusions by HPLC.**

Infusión	Marca comercial	mg/mL				
		Ácido cafeico	Umbeliferona	Quercetina	Apigenina	Herniarina
Manzanilla	Marca A	0.017	0.049	Traza	Traza	0.029 ± 0.005 <sup>a</sup>
	Marca B	Traza	Traza	Traza	Traza	0.019 ± 0.003 <sup>a</sup>
	Marca C	Traza	Traza	ND	Traza	0.015 ± 0.004 <sup>a</sup>
	Marca D	Traza	Traza	ND	Traza	0.016 ± 0.007 <sup>a</sup>
Hierbabuena	Marca A	Eriocitrina 0.41 ± 0.04 <sup>a</sup>	Hesperidina 0.25 ± 0.05 <sup>a</sup>	Ácido rosmarínico 0.63 ± 0.12 <sup>a</sup>		
	Marca B	0.36 ± 0.10 <sup>a</sup>	0.31 ± 0.05 <sup>a</sup>	0.57 ± 0.06 <sup>a</sup>		
	Marca C	0.38 ± 0.02 <sup>a</sup>	0.26 ± 0.01 <sup>a</sup>	0.41 ± 0.02 <sup>a</sup>		
	Marca D	0.50 ± 0.07 <sup>a</sup>	0.24 ± 0.03 <sup>a</sup>	0.60 ± 0.12 <sup>a</sup>		
Té verde	Marca B	Ácido cafeico 0.41 ± 0.09 <sup>a</sup>	EGCG 2.84 ± 0.42 <sup>a</sup>	Catequina 6.85 ± 0.86 <sup>a</sup>		

ND= no detectado. Los resultados son el promedio de 3 experimentos independientes ± EE. <sup>a,b</sup> valores con la misma letra dentro de cada columna no son significativamente diferentes una de la otra ( $p < 0.05$ ).

En las infusiones de té verde se identificaron los compuestos catequina, EGCG y ácido cafeico (Figura 1), siendo la catequina el compuesto principal (6.85 mg/ml), seguido de EGCG (2.84 mg/ml). Borse *et al.* (2007) reportaron el perfil de HPLC de extractos acuoso y metanólico del té verde (sin concentrar por liofilización), identificando únicamente ácido gálico y cafeína en el extracto acuoso y catequina, EGCG, galato de galocatequina (GCG), galato de epicatequina (ECG) y cafeína en el extracto metanólico, siendo el GCG el mayor compuesto (0.31 mg/mg) seguido de la catequina y EGCG (0.0645 y 0.1774 mg/mg, respectivamente). Los diferentes resultados en cuanto a la concentración de catequina en el té verde puede deberse al método de preparación de la muestra (Wang y Ho, 2009). En general, los resultados indican que entre las diferentes marcas comerciales de las infusiones evaluadas, las muestras de boldo y hierbabuena presentan el contenido más alto de compuestos fenólicos y la mayor capacidad antioxidante, sugiriendo el alto potencial de estas infusiones en la prevención de enfermedades crónicas degenerativas.

### Inhibición de la enzima ciclooxigenasa-2 (COX-2)

A nivel celular, el estrés oxidativo puede dañar proteínas, lípidos y otras biomoléculas causando eventualmente inflamación sistemática crónica, implicada en diversas enfermedades crónicas (Halliwell *et al.*, 2005; Hwang *et al.*, 2008). Los procesos inflamatorios están regulados por diversos mediadores a través de diferentes mecanismos de acción; uno de estos mediadores es la enzima ciclooxigenasa-2 (COX-2), la cual se encuentra sobreexpresada durante

38%, luteolin-7-O-rutinoside 3.5%, hesperidin 2.9%, diosmin 0.8%, isoroifolin 0.6%, narirutin 0.3%, rosmarinic acid 3.7% and caffeic acid 0.05% (Sroka *et al.*, 2005).

In the green tea infusions the compound catechin, EGCG and caffeic acid were identified (Figure 1), being catechin the main compound (6.85 mg/ml), followed by EGCG (2.84 mg/ml). Borse *et al.* (2007) reported HPLC profile for aqueous and methanolic extract from green tea (without concentrate by lyophilization), identifying only gallic acid and caffeine in the aqueous extract and catechin, EGCG, gallocatechin gallate (GCG), epicatechin gallate (ECG) and caffeine in the methanolic extract, being GCG the main compound (0.31 mg/mg), followed by catechin and EGCG (0.0645 and 0.1774 mg/mg, respectively). The different results as for catechin concentration in green tea can be due preparation method of sample (Wang and Ho, 2009).

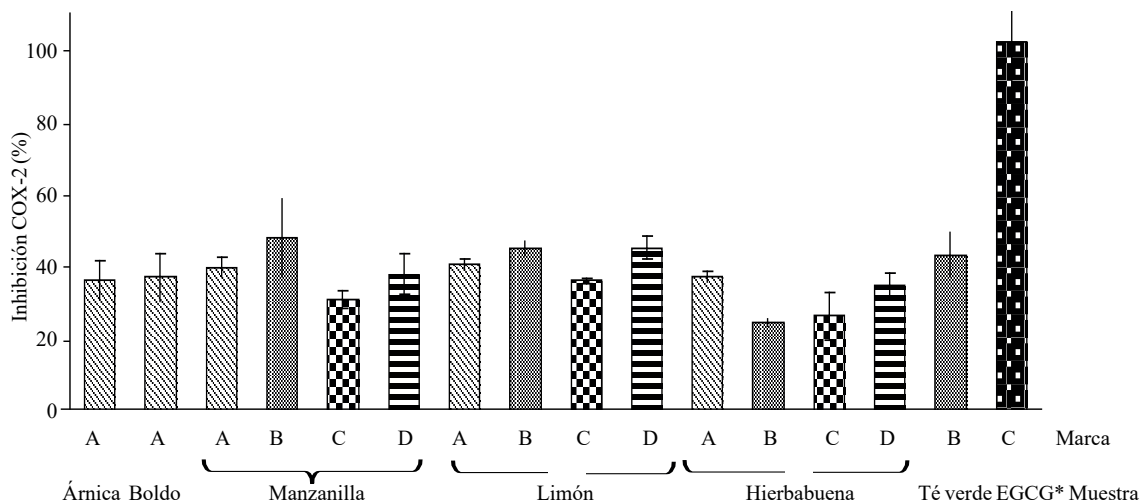
In general, the results indicate that between different commercial brands of assessed infusions, the samples of boldo and peppermint show the highest content of phenolic compounds and the highest antioxidant capacity, suggesting the high potential of these infusions for preventing chronic degenerative diseases.

### Inhibition of enzyme cyclooxygenase-2 (COX-2)

At cell level, oxidative stress can damage proteins, lipids and other biomolecules eventually causing chronic systemic inflammation, implied in several chronic diseases (Halliwell *et al.*, 2005; Hwang *et al.*, 2008). The inflammatory

la inflamación (Anant y Sureban, 2007). Además, se ha observado un incremento en su expresión en etapas tempranas de la tumorigénesis, incluyendo las etapas tempranas de la formación de adenomas (Hao *et al.*, 1999). La capacidad de las infusiones comerciales para inhibir COX-2 se muestra en la Figura 2, donde el compuesto EGCG se incluyó como un control positivo. Las muestras de manzanilla y té verde, ambas de la marca B, así como las muestras de limón marcas B y D, tuvieron el mayor porcentaje de inhibición sobre COX-2 (48, 43, 45 y 45%, respectivamente), resaltando la actividad antiinflamatoria de estas infusiones; mientras que las muestras de hierbabuena de la marca B mostraron el porcentaje de inhibición mas bajo (24%). Las diferencias significativas entre las diferentes infusiones pueden atribuirse principalmente a la composición de compuestos fenólicos (ácidos fenólicos, flavonoides y cumarinas).

processes are ruled by diverse drivers through several action mechanisms; one of these drivers is enzyme cyclooxygenase-2 (COX-2), which is saturated during inflammation (Anant and Sureban, 2007). Also, it has been seen an increase in its expression in early stages of tumorigenesis, including early stages of adenomas formation (Hao *et al.*, 1999). The capacity of commercial infusions to inhibit COX-2 is shown in Figure 2, where EGCG compound was included like positive control. Samples of chamomile and green tea, both from brand B, as well as samples of lemon brand B and D, had higher percentage of inhibition over COX-2 (48, 43, 45 and 45%, respectively), outstanding the anti-inflammatory activity of these infusions; while samples of peppermint from brand B showed the lowest percentage of inhibition (24%). The significant differences between infusions can be attributable mainly to composition of phenols (phenolic acids, flavonoids and coumarine).



**Figura 2. Efecto de las infusiones comerciales sobre la inhibición de la enzima ciclooxigenasa-2 (COX-2).** \*EGCG= epigalocatequina galato a una concentración de 50 µg/mL se incluyó como un control para la inhibición de COX-2.

**Figure 2. Effect of commercial infusions on inhibition of enzyme cyclooxygenase-2 (COX-2).** \*EGCG= epigalocatequina galate a a concentration of 50 µg/mL was included as a control for inhibition the COX-2.

Se ha sugerido que la capacidad antioxidante de polifenoles presentes en los tés herbales juega un papel importante en la actividad antiinflamatoria de las mismas. Por otro lado, estudios donde se han usado diversos ensayos de capacidad antioxidante muestran incrementos significativos en la capacidad antioxidante de plasma de humano una hora después de haber consumido cantidades moderadas de té (Rietveld y Wiseman, 2003). Diversos compuestos fenólicos presentes en el té poseen propiedades antiinflamatorias, tanto en estudios *in vitro* como en modelos animales, particularmente durante el estrés oxidativo (Rahman *et al.*, 2006).

It has been suggested that antioxidant capacity of polyphenols existing in herbal teas play an important role in their anti-inflammatory activity. On the other hand, studies where several tests have been used for antioxidant capacity show significant increases in antioxidant capacity of human blood plasma an hour after taking moderate amounts of tea (Rietveld and Wiseman, 2003). Diverse phenolic compounds that exist in tea have anti-inflammatory properties, as well during *in vitro* studies like in animals, in particular during oxidative stress (Rahman *et al.*, 2006). In this regard it has been detected that compound EGCG, main component of green tea, is related with the

En particular, se ha observado que el compuesto EGCG, el mayor constituyente del té verde, está relacionado con la disminución en la expresión de las enzimas COX-2 y óxido nítrico sintasa (NOS) a través del bloqueo de la activación del factor nuclear NF- $\kappa$ B (Surh *et al.*, 2001). Beltz *et al.*, (2006) demostraron que los polifenoles del té verde y negro inhiben la sobrevivencia de células cancerosas y propusieron que la inhibición de la actividad de COX-2 (62-73%) es el principal mecanismo involucrado en esta propiedad. También, se ha demostrado *in vitro* que la quercetina promueve la inhibición de las enzimas COX y lisil oxidasa (LOX), esta última importante en el proceso metastásico (Laughton *et al.*, 1991; Kim *et al.*, 1998). En este sentido, la ausencia de compuestos como la quercetina y EGCG en las muestras de hierbabuena podría explicar la falta de inhibición de COX-2 (Cuadro 3); sin embargo, estos compuestos tampoco se detectaron en las muestras de limón, por lo que en un futuro sería importante realizar un estudio más detallado del perfil de compuestos en estas muestras.

## Conclusiones

El presente estudio aplicó diversos ensayos *in vitro* de capacidad antioxidante para proveer un perfil más completo de las propiedades antioxidantes de las infusiones herbales comerciales, así como de la actividad antiinflamatoria. Los resultados demostraron que, a pesar de que la capacidad antioxidante (principalmente la actividad antirradical y el poder reductor) está estrechamente relacionada con los compuestos fenólicos, también cuantificados por HPLC, se observaron claras diferencias entre las diversas infusiones y sus marcas comerciales. En este sentido, la infusión de boldo de la marca comercial A presentó el mayor contenido de compuestos fenólicos, seguida de las infusiones de hierbabuena marcas A - D. De manera similar, la infusión de boldo de la marca A mostró la mayor capacidad antioxidante por la técnica ABTS, seguida de las infusiones de hierbabuena marcas A - D por el método FRAP; mientras que, las cuatro marcas comerciales de las infusiones de manzanilla y hierbabuena mostraron la mayor actividad quelante. Por otro lado, la marca comercial B de las infusiones de manzanilla y limón presentaron la mayor actividad antiinflamatoria medida por la inhibición de COX-2. En general, los resultados sugirieron que las infusiones herbales aquí evaluadas, basadas en la preferencia de consumo entre la población mexicana, tienen propiedades biológicas con un potencial benéfico para la salud humana.

decrease of expression of COX-2 enzymes and nitric oxide synthase (NOS) through blocking activation of nuclear factor NF- $\kappa$ B (Surh *et al.*, 2001). Beltz *et al.*, (2006) proved that green tea polyphenols inhibit survival of carcinogen cells and proposed that inhibition of COX-2 (62-73%) activity is the main process involved in this property. Also, it has been proven *in vitro* that quercetin promotes inhibition of COX and lysyl oxidase (LOX) enzymes, being this last one key in metastasis process (Laughton *et al.*, 1991; Kim *et al.*, 1998). In this sense, absence of compounds like quercetin and EGCG in peppermint samples could explain lack of inhibition of COX-2 (Table 3); however, these compounds either were detected in lemon samples, then in the future would be important to perform a more detailed study about compounds profile in these samples.

## Conclusions

This study applied several *in vitro* tests regarding antioxidant capacity with the purpose to supply a comprehensive profile of commercial herbal infusions, as well as anti-inflammatory activity. The results showed that, despite antioxidant capacity (mainly antiradical activity and reducing power) is closely related with phenolic compounds, also quantified by HPLC, there were detected clear differences between the diverse infusions and their commercial brands. In this sense, boldo infusion from commercial brand A had highest phenolic compounds content, followed by peppermint infusions brands A - D. Similarly, boldo infusion brand A showed the highest antioxidant capacity by ABTS technique, followed by peppermint infusions brands A - D by FRAP method; while four commercial brands of chamomile and peppermint infusions showed the highest chelant activity. On the other hand, commercial brand B of chamomile and lemon infusions had the highest anti-inflammatory activity measured by COX-2 inhibition. In general, the results suggested that herbal infusions herein assessed, based in consumption preference among Mexican population, had biological properties with beneficial potential for human health.

*End of the English version*





## Agradecimientos

Los autores(as) agradecen al Fondo Mixto de Fomento a la Investigación Científica y Tecnológica (CONACYT) - Gobierno del estado de Querétaro, QRO-2008-CO2-10090, por el financiamiento otorgado para la realización de este trabajo.

## Literatura citada

- Abbas, A. K.; and Lichtman, A. H. 2003. Cellular and molecular immunology. 5<sup>th</sup> ed. Ed. Saunders. Philadelphia, PA. 490 pp.
- Anant, S. and Sureban, S. M. 2007. Cyclooxygenase-2 gene expression. In: R. Srivastava (eds). Apoptosis, cell signaling, and human diseases: Molecular mechanisms, volume 2. Ed. Humana Press Inc. Totowa, New Jersey. 197-210 pp.
- Beltz, L. A.; Bayer, D. K.; Moss, A. L., and Simet, I. M. 2006. Mechanisms of cancer prevention by green and black tea polyphenols. *Anti-Cancer Agents Med. Chem.* 6:389-406.
- Benzie, I. F. F., and Szeto, Y. T. 1999. Total antioxidant capacity of teas by the ferric reducing/antioxidant power assay. *J. Agric. Food Chem.* 47:633-636.
- Borse, B. B.; Kumar, H. V. and Rao, L. J. M. 2007. Radical scavenging conserves from unused fresh green tea leaves. *J. Agric. Food Chem.* 55:1750-1754.
- Carlsen, H. M.; Halvorsen, B. L. Holte, K.; Bohn, S. K.; Dragland, S.; Sampson, L.; Willey, C.; Senoo, H.; Umezono, Y.; Sanada, C.; Barikmo, I. E.; Berhe, N.; Willett, W. C.; Phillips, K. M.; Jacobs, D. R. and Blomhoff, R. 2010. The total antioxidant content of more than 3100 foods, beverages, spices, herbs and supplements used worldwide. *Nutr. J.* 9:3-13.
- Crozier, A.; Lean, M.; McDonald, M. and Black, C. 1997. Quantitative analysis of the flavonoid content of commercial tomatoes, onions, lettuce and celery. *J. Agric. Food Chem.* 45:590-595.
- Dewanto, V.; Wu, X.; Adom, K.; and Lui, R. 2002. Thermal processing enhances the nutritional value of tomatoes by increasing total antioxidant activity. *J. Agric. Food Chem.* 50:3010-3014.
- Fecka, I. and Turek, S. 2007. Determination of water-soluble polyphenolic compounds in commercial herbal teas from Lamiaceae: peppermint, Melissa and sage. *J. Agric. Food Chem.* 55:10908-10917.
- Firuzi, O.; Lacanna, A.; Petrucci, R.; Marrosu, G. and Saso, L. 2005. Evaluation of the antioxidant activity of flavonoids by "Ferric reducing antioxidant power" assay and cyclic voltammetry. *Biochim. Biophys. Acta.* 1721:174-184.
- Friedman, M.; Levin, C. E.; Lee, S. U. and Kozukue, N. 2009. Stability of green tea catechins in commercial tea leaves during storage for 6 months. *J. Food Sci.* 74(2):47-51.
- Guzman, M. S. H.; Torres, P. I.; Mora, A. A.; Acosta, G. J. A.; Miranda, L. R. y Guevara, L. R. 2005. Potencial de plantas de uso común en México como fuente de compuestos fenólicos, hierro y vitamina C. *Agric. Téc. Méx.* 31(2):115-123.
- Halliwell, B.; Rafter, J. and Jenner, A. (2005): Health promotion by flavonoids, tocopherols, tocotrienols, and other phenols: direct or indirect effects? Antioxidant or not? *Am. J. Clin. Nutr.* 81:268S-276S.
- Hao, X.; Bishop, A. E. and Wallace, M. 1999. Early expression of cyclooxygenase-2 during sporadic colorectal carcinogenesis. *J. Pathol.* 187:295-301.
- Herrero-Martínez, J. M.; Sanmartin, M.; Rosés, E. and Ràfols, C. 2005. Determination of dissociation constants of flavonoids by capillary electrophoresis. *Electrophoresis.* 26:1886-1895.
- Hinneburg, I.; Dorman, H. J. D. and Hiltunen, R. 2006. Antioxidant activities of extracts from selected culinary herbs and spices. *Food Chem.* 97:122-129.
- Høstmark, A. T. 2010. The oslo health study: a dietary index estimating high intake of soft drinks and low intake of fruits and vegetables was positively associated with components of the metabolic syndrome. *Appl. Physiol. Nutr. Metab.* 35:816-825.
- Hwang, J. S.; Wu, T. L.; Chou, S. C.; Ho, C.; Chang, P. Y.; Tsao, K. C.; Huang, J. Y.; Sun, C. F. and Wu, J. T. 2008. Development of multiple complications in type 2 diabetes is associated with the increase of multiple markers of chronic inflammation. *J. Clin. Lab. Anal.* 22(1):6-13.
- Jullien, F. 2007. Mint. In: Pua, E-C. and Davey, M. R. (eds). *Biotechnology in Agriculture and Forestry.* Volume 59. Ed. Springer-Verlag. Berlin Heidelberg. Germany. 435-466 pp.
- Kim, H. P.; Mani, I.; Iversen, L. and Ziboh, V. A. 1998. Effects of naturally-occurring flavonoids and biflavonoids on epidermal cyclooxygenase and lipoxygenase from guinea-pigs. *Prostaglandins Leukot. Essent. Fatty Acids.* 58(1):17-24.

- Laughton, M. J.; Evans, P. J.; Moroney, M. A.; Houlst, J. R. and Halliwell, B. 1991. Inhibition of mammalian 5-lipoxygenase and cyclo-oxygenase by flavonoids and phenolic dietary additives. Relationship to antioxidant activity and to iron ion-reducing ability. *Biochem. Pharmacol.* 42(9):1673-1681.
- Liu, M.; Li, X. Q.; Weber, C.; Lee, C. Y.; Brown, J. and Liu, R. H. 2002. Antioxidant and antiproliferative activities of raspberries. *J. Agric. Food Chem.* 50:2926-2930.
- McKay, D. L. and Blumberg, J. B. 2006. A review of the bioactivity and potential benefits of chamomile tea (*Matricaria recutita* L.). *Phytother. Res.* 20:519-530.
- Meyer, M. C.; Rastogi, P.; Beckett, C. S. and McHowat, J. 2005. Phospholipase A2 inhibitors as potential antiinflammatory agents. *Curr. Pharm. Des.* 11:1301-1312.
- Mira, L.; Fernández, M. T.; Santos, M.; Rocha, R.; Florencio, M. H. and Jennings, K. R. 2002. Interactions of flavonoids with iron and copper ions: A mechanism for their antioxidant activity. *Free Radic. Res.* 36:1199-1208.
- Moraes de Souza, R. A.; Oldoni, T. L. C.; Regitano d'Arce, M. A. B.; and Alencar, S. M. 2008. Antioxidant activity and phenolic composition of herbal infusions consumed in Brazil. *Ciencia Tecnol. Alimentaria.* 6(1):41-47.
- Nenadis, N.; Wang, L. F.; Tsimidou, M. and Zhang, H. Y. 2004. Estimation of scavenging activity of phenolic compounds using the ABTS<sup>+</sup> Assay. *J. Agric. Food Chem.* 52:4669-4674.
- Pereira, R. P.; Fachineto, R.; Prestes, A. S.; Puntel, R. L. and Heinzmann, B. M. 2009. Antioxidant effects of different extracts from *Melissa officinalis*, *Matricaria recutita* and *Cymbopogon citratus*. *Neurochem. Res.* 34:973-983.
- Rahman, I.; Biswas, S. K. and Kirkham, P. A. 2006. Regulation of inflammation and redox signaling by dietary polyphenols. *Biochem. Pharmacol.* 72:1439-1452.
- Rietveld, A. and Wiseman, S. 2003. Antioxidant effects of tea: evidence from human clinical trials. *J. Nutr.* 133:3285-3292.
- Rivera, J. A.; Muñoz-Hernández, O.; Rosas-Peralta, M.; Aguilar-Salinas, C. A.; Popkin, B. M. y Willett, W.C. 2008. Consumo de bebidas para una vida saludable: recomendaciones para la población mexicana. *Salud Pública de México.* 50(2):173-195.
- Sikora, J. P.; Chlebna-Soko'ł, D.; Andrzejewska, E.; Chrul, S.; Polakowska, E.; Wysocka, A. and Sikora, A. 2008. Clinical evaluation of proinflammatory cytokine inhibitors (sTNFR I, sTNFR II, IL-1 ra), antiinflammatory cytokines (IL-10, IL-13) and activation of neutrophils after burn-induced inflammation. *Scand. J. Immunol.* 68(2):145-152.
- Singh, R.; Akhtar, N. and Haqqi, T. M. 2010. Green tea polyphenolepigallocatechin-3-gallate: inflammation and arthritis. *Life Sci.* 86(25-26):907-918.
- Sroka, Z.; Fecka, I. and Cisowski, W. 2005. Antiradical and anti-H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> properties of polyphenolic compounds from an aqueous peppermint extract. *Naturforsch, C. Z.* 60(11-12):826-832.
- Surh, Y. J.; Chun, K. S.; Cha, H. H.; Han, S. S.; Keum, Y. S. and Park, K. K. 2001. Molecular mechanisms underlying chemopreventive activities of antiinflammatory phytochemicals: down-regulation of COX-2 and iNOS through suppression of NF-kappa B activation. *Mutat. Res.* 480-81:243-268.
- Wang, Y. and Ho, C.T. 2009. Polyphenolic chemistry of tea and coffee: a century of progress. *J. Agric. Food Chem.* 57(18):8109-8114.
- Wiart, C. 2007. Anti-inflammatory plants. *In: ethnopharmacology of medicinal plants: Asia and the Pacific.* Ed. Humana Press Inc. Totowa, New Jersey. Chapter 1. 1-56 pp.
- Wiseman, S. A.; Balentine, D. A. and Frei, B. 1997. Antioxidants in tea. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* 37:705-718.