



UNIVERSIDAD DE CHILE

FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS Y FARMACÉUTICAS

Departamento de Química Farmacológica y Toxicológica

Laboratorio de Farmacología y Toxicología

CARACTERIZACIÓN DE EXTRACTOS HIDROALCOHÓLICO Y ACUOSO DE

***Cestrum parqui* L'HERIT (PALQUI) RESPECTO DE SU ACTIVIDAD**

ANTIOXIDANTE Y SURFACTANTE

DIRECTOR

Prof. María Eugenia Letelier M.
Laboratorio de Farmacología y
Toxicología
Facultad de Ciencias Químicas
y Farmacéuticas
Universidad de Chile

PATROCINANTE

Prof. María Eugenia Letelier M.
Laboratorio de Farmacología y
Toxicología
Facultad de Ciencias Químicas
y Farmacéuticas
Universidad de Chile

Memoria para optar al título de Químico Farmacéutico

HUGO SEBASTIÁN SOTO NÚÑEZ

Santiago de Chile

2014

Dedicada con mucho amor a mis padres Hugo y Marta.

*“Farmacia, iglesia de los desesperados, con un pequeño dios en cada píldora:
a menudo eres demasiado cara, el precio de un remedio cierra tus claras puertas
y los pobres con la boca apretada vuelven al cuarto oscuro del enfermo,
que llegue un día gratis de farmacia,
que no sigas vendiendo la esperanza,
y que sean victorias de la vida,
de toda vida humana contra la poderosa muerte, tus victorias.
Y así serán mejores tus laureles,
serán más olorosos los sulfatos,
más azul el azul de metileno
Y más dulce la paz de la quinina.”*

- Pablo Neruda

AGRADECIMIENTOS

Agradezco a Dios por darme una existencia feliz. A mis padres, Hugo y Marta, por su amor incondicional y apoyo irrestricto. Definitivamente me faltará vida para agradecerles todo el sacrificio y dedicación que han puesto en criarme y educarme. A mi amada compañera de la vida, Andrea Saravia, gracias por tu amor, comprensión y paciencia. A mi hermana Marcela y a mis sobrinos Amaro y Alondra, gracias por hacerme sentir el mejor. A mi querida familia Bollo Doizi: tía Luz María, Mariano y Picky, gracias por ser un hijo y hermano más. A mis compadres María José, Guille y Dani, a mi regalón Agustín, gracias por estar siempre a mi lado. A mi prima Carolina por sus buenos deseos. A mis abuelos, Pedro y Aurora. A mis tíos Juan, Hilda, Mario, Tere, Juanuco, Marcelo y Aurora. Gracias al extenso clan Orellana por darme su cariño.

A mi amigo Francisco Ormazábal, por su apoyo en el trabajo y en la vida cotidiana. A mis amigos de colegio Francisco Cadenas y Francisco Miranda, por mantenernos unidos. A mis amigos de la universidad: Sebastián, Felipe, Óscar, Wilson, Daniela y Andrés. Muchas gracias a Don José Riquelme, rectitud y servicio a los demás son dones cada vez más escasos en el mundo de hoy. Al Dr. José Jara y a los chicos de medicina: Luis Felipe, Rodrigo y Simón, gracias por su colaboración en los experimentos. Al Dr. Mario Faúndez por su tiempo y apoyo en la búsqueda de soluciones. Gracias a la Dra. Ximena Polanco por la donación de los extractos.

Muy especialmente, agradezco a la Profesora Dra. María Eugenia Letelier, por su inagotable esfuerzo y apoyo en dirigir y sacar adelante nuestras memorias. Sin duda esta lección de compromiso y amor por el trabajo quedará marcada en nuestras vidas.

ABREVIATURAS

BSA	: albúmina sérica de bovino
DTNB	: ácido-5,5'-ditio- <i>bis</i> -(2-nitrobenzoico)
PBS	: amortiguador fosfato salino
ROS	: especies reactivas de oxígeno
TBA	: ácido-2-tiobarbitúrico
TBARS	: especies reactivas al ácido tiobarbitúrico
TCA	: ácido tricloroacético
TNB	: ácido-5-tio- <i>bis</i> -(2-nitrobenzoico)

ÍNDICE GENERAL

	Página
PORTADA	I
DEDICATORIA	II
AGRADECIMIENTOS	III
ABREVIATURAS	IV
ÍNDICE GENERAL	V
ÍNDICE DE FIGURAS	VII
ÍNDICE DE TABLAS	IX
RESUMEN	X
ABSTRACT	XI
I. INTRODUCCIÓN	1
Hipótesis.	7
Objetivo general.	8
Objetivos específicos.	8
II. MATERIALES Y MÉTODOS	9
Reactivos.	9
Animales de experimentación.	9
Preparación de microsomas hepáticos de rata.	10
Cuantificación de polifenoles.	10
Condiciones oxidativas.	11
Lipoperoxidación microsómica.	11

Determinación de tioles microsómicos.	12
Espectro de absorbancia del Cu^{2+} en presencia extractos de palqui.	14
Determinación de hemoglobina.	15
Análisis estadístico.	15
III. RESULTADOS	16
Polifenoles totales de los extractos de palqui.	16
Prevención de la lipoperoxidación microsómica inducida por el sistema Fe^{3+} /ascorbato en presencia de los extractos de palqui.	17
Prevención de la oxidación de tioles microsómicos inducida por el sistema Fe^{3+} /ascorbato en presencia de los extractos de palqui.	21
Reversión de la oxidación de tioles microsómicos inducida por el sistema Fe^{3+} /ascorbato en presencia de los extractos de palqui.	25
Capacidad quelante de Cu^{2+} de los extractos de palqui.	29
Liberación de hemoglobina de una suspensión de glóbulos rojos en presencia de los extractos de palqui.	32
IV. DISCUSIÓN	37
V. CONCLUSIONES	41
VI. PROYECCIONES	41
VII. REFERENCIAS	42

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura N°		Página
1	Sapogeninas del palqui.	2
2	Catequina.	10
3	Formación del conjugado.	11
4	Reacción entre el DTNB y los residuos tiólicos proteicos.	14
5	Efecto de los extractos de palqui sobre la prevención de la lipoperoxidación microsómica inducida por el sistema Fe ³⁺ /ascorbato.	18
6	Gráficos semilogarítmicos del efecto de los extractos de palqui sobre la prevención de la lipoperoxidación microsómica inducida por el sistema Fe ³⁺ /ascorbato.	19
7	Efecto de los extractos de palqui sobre la prevención de la oxidación de tioles microsómicos inducida por el sistema Fe ³⁺ /ascorbato.	22
8	Gráficos semilogarítmicos del efecto de los extractos de palqui sobre la prevención de la oxidación de tioles microsómicos inducida por el sistema Fe ³⁺ /ascorbato.	23
9	Efecto de los extractos de palqui sobre la reversión de la oxidación de tioles microsómicos inducida por el sistema Fe ³⁺ /ascorbato.	26
10	Gráficos semilogarítmicos del efecto de los extractos de palqui sobre la reversión de la oxidación de tioles microsómicos inducida por el sistema Fe ³⁺ /ascorbato.	27
11	Modificación del espectro de absorbancia de Cu ²⁺ en presencia de los extractos de palqui. [CuSO ₄]: 0,5 mM.	31

12	Efectos de los extractos de palqui sobre la liberación de hemoglobina de una suspensión de glóbulos rojos.	34
13	Gráficos semilogarítmicos del efecto de los extractos de palqui sobre la liberación de hemoglobina de una suspensión de glóbulos rojos.	35

ÍNDICE DE TABLAS

TABLA N°		Página
1	Polifenoles totales.	16
2	Efecto comparativo de los extractos de palqui sobre la prevención de la lipoperoxidación microsómica inducida por el sistema Fe ³⁺ /ascorbato.	20
3	Efecto comparativo de los extractos de palqui sobre la prevención de la oxidación de tioles microsómicos inducida por el sistema Fe ³⁺ /ascorbato.	24
4	Efecto comparativo de los extractos de palqui sobre la reversión de la oxidación de tioles microsómicos inducida por el sistema Fe ³⁺ /ascorbato.	28
5	Efecto comparativo de los extractos de palqui sobre la liberación de hemoglobina de una suspensión de glóbulos rojos.	36
6	Efecto comparativo de los extractos de palqui sobre la liberación de hemoglobina de una suspensión de glóbulos rojos y sobre la prevención de la lipoperoxidación microsómica.	36

CARACTERIZACIÓN DE EXTRACTOS HIDROALCOHÓLICO Y ACUOSO DE *Cestrum parqui* L'HERIT RESPECTO DE SU ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE Y SURFACTANTE

Cestrum parqui L'Herit (n.v. palqui) es una planta originaria de Sudamérica cuyos efectos benéficos descritos incluyen acción antipirética y sudorífica, tratamiento de diversas afecciones a la piel como quemaduras, eczema, impétigo y herpes. Hasta hoy, sólo se ha podido establecer científicamente su efecto antiinflamatorio y un discreto efecto antipirético. Sin embargo, se han descrito intoxicaciones agudas en bovinos y ovinos asociadas al consumo de palqui. Los efectos tóxicos incluyen necrosis hepática severa y hemorragia generalizada en los animales. Los estudios científicos relacionados con los efectos benéficos y tóxicos de esta planta son escasos. Es por ello, que en este trabajo se caracterizaron dos extractos, uno hidroalcohólico y el otro acuoso, de hojas y tallos de la parte aérea de *Cestrum parqui* L'Herit respecto de su capacidad antioxidante y surfactante.

Ambos extractos previnieron en distinta magnitud, la oxidación de los lípidos y los tioles proteicos microsómicos, fenómenos inducidos por el sistema Fe^{3+} /ascorbato. El extracto hidroalcohólico resultó ser el mejor antioxidante, aunque su concentración de polifenoles fue 4,2 veces menor que la del extracto acuoso. Asimismo, el extracto hidroalcohólico fue 8,5 veces más potente en causar la liberación de hemoglobina eritrocitaria, por lo tanto, el de mayor actividad surfactante. Estos resultados indicarían que las diferencias en las actividades estudiadas dependen no sólo de la concentración de antioxidantes, sino además, de otras variables. Así, la calidad y cantidad de los principios activos extraídos desde la droga vegetal dependen principalmente del solvente utilizado. Al final del manuscrito, los resultados se discuten desde el punto de vista farmacológico.

**CHARACTERIZATION OF HYDROALCOHOLIC AND AQUEOUS EXTRACTS
OF *Cestrum parqui* L'HERIT IN RESPECT OF ITS ANTIOXIDANT AND
SURFACTANT ACTIVITY**

Cestrum parqui L'Herit (c.n. palqui) is a native plant of South America whose beneficial effects described includes sudorific and antipyretic action, treatment of various skin conditions such as burns, eczema, impetigo and herpes. Until now, only have been scientifically established its anti-inflammatory and antipyretic effects. Acute poisonings however have been reported in cattle and sheep associated with consumption of palqui. Toxic effects include severe liver necrosis and hemorrhage widespread in animals. Scientific studies related to the beneficial and toxic effects of this plant are scarce. Thus, in this work two extracts, one alcoholic and one aqueous, from leaves and stems of the aerial part of *Cestrum parqui* L'Herit, were characterized according its antioxidant and surfactant capacities.

Both extracts prevented in different lengths, the oxidation of microsomal lipids and protein thiols, phenomena induced by Fe^{3+} /ascorbate. The hydroalcoholic extract was the best antioxidant although its polyphenol concentration was 4.2 times lower than aqueous extract. Also, the hydroalcoholic extract was 8.5 times more potent in causing erythrocyte hemoglobin release, therefore, this extract have the higher surfactant activity. Differences in the activities studied seem to be due not only on the concentration of antioxidants, but also to other variables. The quality and quantity of the active principles that are extracted from vegetable drug depend mainly of the extraction solvent used. This is especially important when it comes to polyvalent extracts. At the end of the manuscript, the results are discussed from the pharmacological point of view.



***Cestrum parqui* L'Herit**

I. INTRODUCCIÓN

Cestrum parqui L'Herit (n.v. palqui), es una planta de la familia de las solanáceas originaria de Chile, Argentina, Perú, Uruguay y Brasil. En Chile, esta especie endémica crece principalmente en suelos degradados y secos a la orilla de los caminos de las provincias centrales. Crece también en otras partes del mundo, como en Australia, donde se le considera una maleza (Mc Lennan M. W. y Kelly W. R., 1984).

El palqui ha tenido diversos usos a través de los años. La etnomedicina recomienda la infusión de su tallo desprovisto de la corteza como antipirético y sudorífico. Las hojas se emplean para tratar diversas afecciones a la piel, como por ejemplo, para lavar heridas, como emplastos para espasmos y quemaduras, para aliviar el prurito que produce el litre y además, para tratar el eczema, el impétigo y los herpes (Montes M. y Wilkomirsky T., 1987). Hasta hoy, sólo se ha podido establecer científicamente su efecto antiinflamatorio y un discreto efecto antipirético (Backhouse N. y cols., 1996), además de un efecto pesticida (Chaieb I. y cols., 2007). Sin embargo, a pesar de todas estas bondades, se sabe que esta planta es extremadamente tóxica como forraje animal (Mc Lennan M. W. y Kelly W. R., 1984; Pearce C. y cols., 1992). Las intoxicaciones agudas en bovinos y ovinos asociadas al consumo de palqui, dan lugar a una necrosis hepática severa (Rivero R. y cols., 2011). Necropsias realizadas a estos animales han arrojado hemorragias en pericardio, epicardio, endocardio, músculos esqueléticos, intestino y timo, congestión y edema en los pulmones, cambios en la coloración del hígado y, edema y hemorragia en la vesícula biliar. Microscópicamente, las lesiones más características corresponden a necrosis centrolobulillar, vacuolización irregular del citoplasma de los hepatocitos vecinos a la lesión y leve proliferación de los conductos biliares (Brevis C. y cols., 1999).

Los metabolitos secundarios presentes en esta planta son bastante numerosos. Se han aislado varias sapogeninas, que parecen jugar un rol importante en su toxicidad; algunas de ellas aparecen en la Figura 1 (Barbouche N. y cols., 2001). También se han identificado algunos polifenoles de bajo peso molecular, entre ellos flavonoides y taninos; además de otros compuestos como el ácido triterpénico, el ácido ursólico y la solanina, que es alcaloide tóxico (Montes M. y Wilkomirsky T., 1985). También se ha encontrado parquina y carboxiparquina, compuestos cardiotoxicos (Pearce C. y cols., 1992). Los compuestos involucrados en la toxicidad observada en animales de esta planta, no están aún definidos.

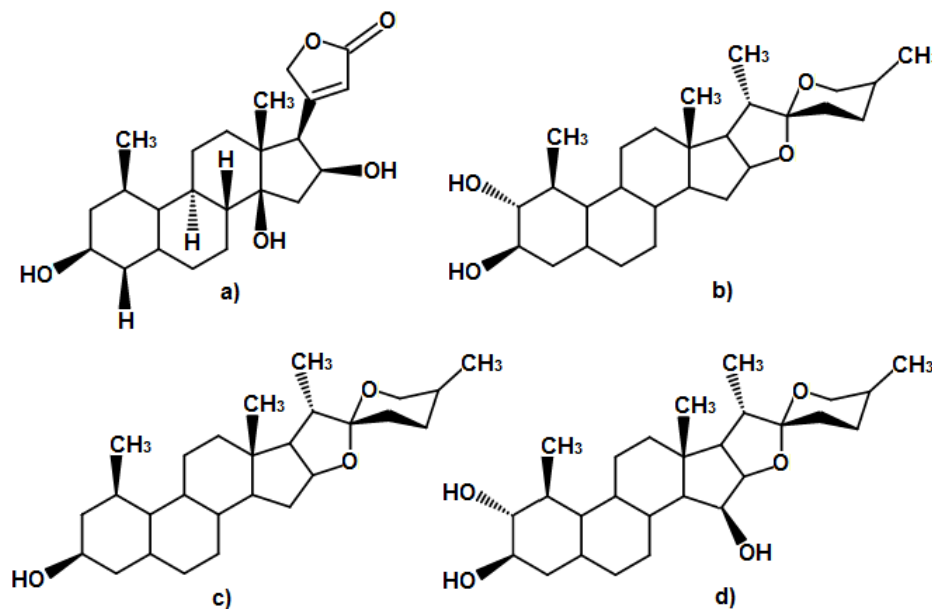


Figura 1. Sapogeninas del palqui: a) gitoxigenina, b) gitogenina, c) tigogenina, d) digitoxigenina

Los antecedentes presentados muestran los escasos estudios existentes acerca de la acción farmacológica y toxicológica de palqui. Es por ello que en este trabajo se pretende caracterizar un extracto hidroalcohólico y uno acuoso de hojas y tallos de la parte aérea de esta planta respecto de:

1. Su actividad antioxidante biológica. Ello porque en mayor o menor grado todas las patologías están asociadas a estrés oxidativo y esta planta podría representar una fuente de ellos.
2. Su actividad surfactante dada por la presencia de saponinas en el extracto, compuestos que podrían estar involucrados en el efecto tóxico hemorrágico observado en animales en pastoreo.

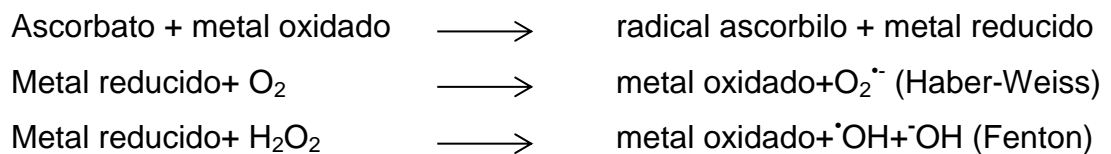
Actividad Antioxidante

La simple exposición de los seres vivos al medioambiente desencadena la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS). El desbalance en la producción de ROS y en la defensa antioxidante provoca estrés oxidativo que conlleva a cambios fisiológicos y bioquímicos que eventualmente terminan en el deterioro y muerte celular. Dicho estrés oxidativo puede provenir de una deficiencia en el sistema de defensa antioxidante, así como también, en el incremento en la formación de ROS, cuya alta reactividad provoca lipoperoxidación, daño en las membranas celulares, rotura del ADN y degradación proteica (Benzie I. F., 2000).

Los organismos vivos poseen mecanismos antioxidantes enzimáticos y no enzimáticos que tienen como objetivo prevenir y disminuir el daño oxidativo. Los mecanismos enzimáticos están representados principalmente por la superóxido dismutasa (SOD) que dismuta el radical anión superóxido ($O_2^{\cdot-}$) a peróxido de hidrógeno; la catalasa que convierte el peróxido de hidrógeno en H_2O y O_2 y la

GSH-peroxidasa que convierte los peróxidos a alcoholes. Los mecanismos no enzimáticos incluyen al GSH, antioxidante tiólico el cual se encuentra en concentraciones mM en la célula, las Vitaminas E, A y C y β -caroteno (Benzie I. F., 2000; Deneke S. M., 2000). Las plantas poseen además, metabolitos de tipo polifenólicos que las protegen de la radiación solar UV, los cuales son especialmente abundantes en sus hojas (De Gara L. y cols., 2010; Kornas A. y cols., 2010).

Los principales mecanismos antioxidantes de los polifenoles y tioles incluyen su capacidad de atrapar radicales libres del oxígeno y de quelar metales de transición en su estado iónico libre, a través de las reacciones de Haber Weiss y/o Fenton (De Gara L. y cols., 2010; Sies H., 2010).



Además de participar en reacciones redox, los compuestos polifenólicos y tiólicos pueden actuar como agentes nucleofílicos (Bors W. y Michel C., 2002; Sies H., 2010; Schafer F. Q. y Buettner G. R., 2001; Wu G. y cols., 2004). Como tales, ellos forman aductos covalentes con metabolitos electrofílicos. A nivel celular, los metabolitos electrofílicos son altamente reactivos y por tanto, muy tóxicos; ellos pueden reaccionar con proteínas y ácidos nucleicos (ARN y ADN) debido a la presencia de grupos amino y sulfhidrilos en estas macromoléculas. Oxidantes no-radicalarios, incluyendo peróxidos, aldehídos, quinonas y epóxidos son generados enzimáticamente de precursores endógenos y exógenos; ellos no requieren intermediarios radicalarios para oxidar compuestos tiólicos celulares (Wouters M. A. y cols., 2010). Si estos oxidantes se generan en forma aberrante, ellos podrían afectar los circuitos tiólicos, alterando las funciones biológicas de ellos. Más aún, los tioles de bajo peso

molecular, GSH y cisteína, pueden actuar como agentes quelantes de iones metálicos, lo cual también podría ocurrir con los grupos tiólicos redox sensibles de proteínas, alterando su función (Brosnan, J. T. y Brosnan, M. E., 2008; Banerjee R., 2008).

Los compuestos electrofílicos pueden ser generados como productos de la biotransformación de xenobióticos, entre ellos los fármacos; son también componentes de los contaminantes ambientales (Newcomb M. y Chandrasena R. E., 2005). Cabe señalar que cuando los compuestos polifenólicos y tiólicos reaccionan como nucleófilos formando aductos, ellos son consumidos irreversiblemente, lo que provoca una disminución de la capacidad antioxidante celular (Klaassen C. D. y Reisman S. A., 2010). En este sentido, los compuestos tiólicos parecen ser agentes nucleofílicos más eficientes que los polifenoles (Fraga C. G. y cols., 2010; Klaassen C. D. y Reisman S. A., 2010).

Existen diferencias entre las propiedades antioxidantes de los compuestos polifenólicos y tiólicos. Así, la oxidación de las biomoléculas tiólicas puede ser revertida por agentes antioxidantes tiólicos, pero no la de los polifenoles (Bors W. y Michel C., 2002; Sies H., 2010). En todo tipo de células esta reversibilidad es el resultado de mecanismos enzimáticos concertados que involucran el uso del tripéptido GSH (Schafer F. Q. y Buettner G. R., 2001; Wu G. y cols., 2004). El estado redox de los sistemas tiólicos que son sensibles a oxidantes no-radicalarios, son controlados por las tiorredoxinas (Trx), GSH y cisteína (Wouters M. A. y cols., 2010; Brosnan, J. T. y Brosnan, M. E., 2008). Los sistemas regulados por las tiorredoxinas y el GSH se mantienen en condiciones estables pero no en equilibrio, debido a una continua oxidación de los tioles celulares; ellos se oxidan a una velocidad aproximada de 0,5% de los tioles totales/min (Brosnan, J. T. y Brosnan, M. E., 2008; Banerjee R., 2008).

De estos antecedentes se concluye que el estrés oxidativo en la célula animal puede ocurrir como consecuencia de un cambio redox de los circuitos tiólicos y del consumo irreversible debido a la formación de aductos covalentes de los tioles (Jones D. P., 2008). El estrés oxidativo inducido a través de los circuitos tiólicos parece ser más importante que el generado por ROS (Wouters M. A. y cols., 2010). Así, existen tioles redox-sensibles presentes en diferentes proteínas y/o péptidos que son críticos en transducción de señales (ej. H-Ras, PTP-1B), factores de transcripción que se unen a DNA (ej. Nrf2, NFκβ), activación de receptores (ej. integrina αIIβ3 en la activación de plaquetas), etc. (Wouters M. A. y cols., 2010). Más aún, el envejecimiento, como también, las enfermedades relacionadas con el envejecimiento se asocian a la interrupción de la función y la homeostasis de los circuitos tiólicos, característica central del estrés oxidativo observado (Wouters M. A. y cols., 2010).

Actividad surfactante

Las lesiones encontradas en los animales se refieren a hemorragias difusas en todo el organismo, lo cual parece relacionarse con la capacidad que tienen las saponinas presentes en esta planta de afectar la membrana celular, en este caso, la de los eritrocitos. Las saponinas se encuentran en la mayoría de las plantas y tienen propiedades detergentes o surfactantes. El componente lipofílico está determinado por un núcleo esteroidal o triterpénico (sapogenina) con una o más cadenas oligoméricas de carbohidratos que representan la parte polar (Cheeke P. R., 2001). El mecanismo de acción surfactante postulado indica que las saponinas se integrarían a la membrana a través de su parte hidrofóbica (sapogenina), formando complejos con los esteroides de la membrana. Los residuos glicosídicos de la saponina quedarían orientados hacia el espacio extracelular. La interacción de estos residuos entre sí, provocada por impedimento estérico de los mismos, causaría curvaturas en la membrana, lo que provocaría la formación de poros y protuberancias. Todas estas

interacciones inducirían un aumento en la permeabilidad y por tanto, un flujo anormal de iones provocando así, un cambio osmótico (Bruneton J., 2001).

Diferentes estudios muestran que en general todas las patologías, en mayor o menor grado, están asociadas a estrés oxidativo: cáncer, envejecimiento, enfermedades cardiovasculares, enfermedades neurodegenerativas, etc. Es por ello el interés de determinar la actividad antioxidante biológica de palqui, planta utilizada por la medicina nativa. Asimismo, cambios en la permeabilidad de las membranas biológicas, como por ejemplo, el aumento de esta propiedad física, puede provocar cambios osmóticos que lleven a la muerte celular (Lacaille Dubois M. A. y Wagner H., 1996). Este fenómeno puede ser causado por las saponinas presentes en los extractos de palqui; de aquí nuestro interés en determinar la capacidad surfactante de ambos extractos.

HIPÓTESIS

Los antecedentes presentados nos llevan a postular que:

Los extractos hidroalcohólico y acuoso de hojas y tallos de la parte aérea de *Cestrum parqui* L'Herit (palqui), se comportan como antioxidantes de lípidos y proteínas; además, exhiben actividad surfactante representada por la liberación de hemoglobina de una suspensión de glóbulos rojos.

OBJETIVO GENERAL

Caracterizar extractos hidroalcohólico y acuoso de hojas y tallos de la parte aérea de *Cestrum parqui* L'Herit (palqui), respecto de su actividad antioxidante y surfactante.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Determinar la concentración total de polifenoles de hojas y tallos de la parte aérea de los extractos de *Cestrum parqui* L'Herit (palqui).
2. Determinar la capacidad de los extractos de prevenir la lipoperoxidación microsómica inducida por el sistema Fe^{3+} /ascorbato.
3. Evaluar la capacidad de los extractos de prevenir y revertir la oxidación de los tioles microsómicos inducida por el sistema Fe^{3+} /ascorbato.
4. Evaluar la capacidad quelante de Cu^{2+} de los extractos de palqui.
5. Determinar la capacidad de los extractos de producir la liberación de hemoglobina de una suspensión de glóbulos rojos, como una medida de su actividad surfactante.

II. MATERIALES Y MÉTODOS

Reactivos. Catequina [(+)-cianidol-3,(2*R*,3*S*)-2-(3,4-dihidroxifenil)-3,4-dihidro-1(2*H*)-benzopiran-3,5,7-triol], ascorbato de sodio y Tritón X-100 se obtuvieron de Sigma-Aldrich. El ácido 5,5'-ditiobis-(2-nitrobenzoico) (DTNB) y la albúmina sérica bovina (BSA, Fracción IV) se obtuvieron de Sigma Chemical Co (EE.UU.). El ácido tricloroacético (TCA), el ácido tiobarbitúrico (TBA), el CuSO₄, el FeCl₃ y el reactivo de Folin-Ciocalteu fueron adquiridos en Merck (Chile). Las muestras de sangre fueron donadas por el Servicio de Laboratorio Clínico del Hospital Clínico de la Universidad de Chile. Los extractos hidroalcohólico y acuoso de palqui fueron donados por Laboratorios Ximena Polanco. La información acerca del proceso de preparación de estos extractos es propiedad de la empresa.

1. Extracto hidroalcohólico de hojas y tallos de la parte aérea de *Cestrum parqui* L'Herit: serie N°: 02 019 3.
2. Extracto acuoso de hojas y tallos de tallos de la parte aérea de *Cestrum parqui* L'Herit: serie N°: 02 022 3.

El resto de los reactivos utilizados fueron del mejor grado analítico.

Animales de experimentación. Se utilizaron ratas macho adultas de la cepa Sprague Dawley, de tres meses de edad y de un de peso corporal aproximado de 250 g. Estos animales se obtuvieron del Bioterio de la Facultad de Medicina de la Universidad de Chile. Los animales se mantuvieron con una dieta normal de *pellet*, agua *ad libitum*, ciclos de luz y oscuridad, y a una temperatura ambiental de 21°C. Todos los procedimientos se desarrollaron de acuerdo a los protocolos aprobados por el Comité Ético Institucional de dicha Facultad.

Preparación de microsomas hepáticos de rata. Esta fracción subcelular se preparó de acuerdo a Letelier, 2010 (Letelier M. E., 2010). Las ratas fueron sometidas a ayuno por 15 horas con agua *ad libitum*, y sacrificadas por decapitación. Los hígados fueron perfundidos *in situ* con 0,9% P/V NaCl, removidos por incisión, y puestos en hielo. Todos los procedimientos de homogenización y fraccionamiento se realizaron a 4°C, y todas las centrifugaciones fueron realizadas usando ya sea una centrifuga con refrigeración Hermle modelo Z326K o una ultracentrifuga Beckman modelo XL-90. El tejido hepático (9-11 g de peso húmedo), carente del tejido conectivo y vascular, fue homogenizado con 4 volúmenes de 0,154 M de KCl, con ocho pasajes en un homogeneizador Dounce Wheaton B utilizando un motor Heidolph modelo RZR1 a 250 rpm. El homogeneizado fue centrifugado a 9.000 g por 15 min y el sedimento se descartó. El sobrenadante obtenido fue centrifugado a 105.000 g por 60 min. El *pellet* (microsomas) se almacenó a -80°C en un *freezer* IL-Shin modelo DF8514 por hasta 2 meses. La cuantificación de la proteína microsómica se determinó por el método de Lowry (Lowry O.H., 1951), utilizando BSA (fracción IV) como estándar.

Cuantificación de Polifenoles: La determinación de polifenoles totales de los extractos se realizó de acuerdo al método de Letelier y cols., 2009 (Letelier M. E. y cols., 2009). Este método utiliza catequina como estándar, mostrada en la Figura 2.

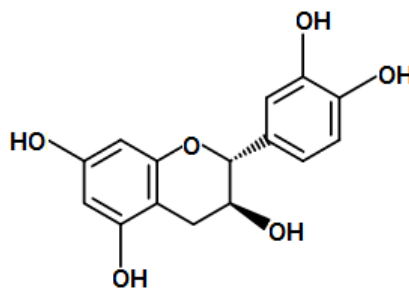


Figura 2. Catequina.

La mezcla de reacción contenía diferentes concentraciones de los extractos de palqui diluidos en agua, 100 μL de reactivo Folin Ciocalteau, 300 μL de carbonato de sodio 20% p/V y agua destilada suficiente para completar 2,0 mL de volumen final. El blanco contenía todos los reactivos con excepción de los extractos de palqui. Todas las mezclas así obtenidas fueron incubadas a oscuridad durante 2 horas. Al finalizar este período, la absorbancia de las muestras fue registrada a 760 nm en un espectrofotómetro UV3 Unicam UV-VIS, usando los blancos respectivos como referencia. La linealidad de este método se analizó realizando una curva de calibración utilizando catequina como estándar.

Condiciones oxidativas: Los microsomas se incubaron con el sistema generador de anión superóxido ($\text{O}_2^{\cdot-}$), FeCl_3 600 μM y ascorbato 1,0 mM, ambas concentraciones finales en la mezcla de reacción.

Lipoperoxidación microsómica: La lipoperoxidación microsómica inducida por el sistema oxidante Fe^{3+} /ascorbato se estimó determinando las sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico (TBARS) de acuerdo al método descrito por Letelier y cols., 2008 (Letelier M. E. y cols., 2008). De acuerdo a la Figura 3, el malondialdehído generado como producto de la descomposición de los lipoperóxidos formados, reacciona con el ácido tiobarbitúrico dando lugar a un conjugado, el cual posee una absorbancia máxima a 532 nm ($\epsilon_{532} = 156.000 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$).

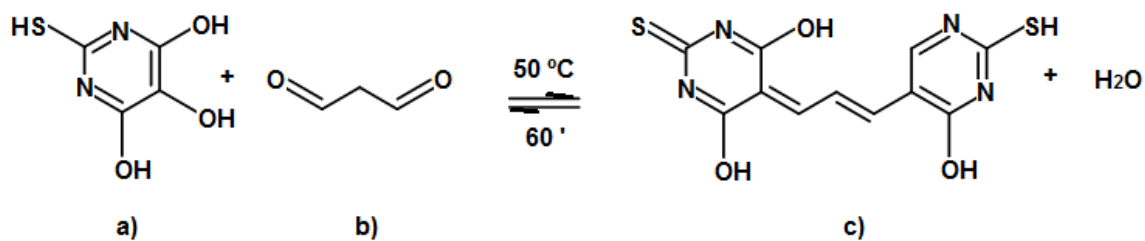


Figura 3. Formación del conjugado: a) ácido tiobarbitúrico, b) malondialdehído, c) complejo de color rosado.

Las mezclas de reacción contenían en un volumen de 1,0 mL los reactivos siguientes (concentraciones finales): microsomas (0,5 mg de proteína) suspendidos en amortiguador fosfato 50 mM, pH 7,4; preincubados con los extractos de palqui durante 15 min en hielo antes de agregar el sistema oxidante. Los blancos contenían todos los reactivos con la única excepción de la proteína microsómica. Añadido el sistema oxidante, FeCl_3 600 μM y ascorbato de sodio 1,0 mM, muestras y blancos se incubaron durante 20 min en un baño termostático Julabo SW-21C a 37°C con agitación constante. Al cabo de este período, se les adicionó a muestras y blancos 0,25 mL de TCA 20% p/V frío (4°C). Luego los tubos que contenían proteína microsómica se centrifugaron a 9.000 g durante 10 min a 4°C en una centrífuga Hermle, modelo Z326K. Alícuotas de 0,5 mL de los sobrenadantes de las muestras y los blancos se mezclaron con 0,5 mL de TBA 35 mM, y luego se incubaron nuevamente durante 60 min a 50°C en un baño termostático con agitación constante para el desarrollo de color. Al término de este período, se registró la absorbancia de las muestras a 532 nm en un espectrofotómetro UV3 Unicam UV-VIS, usando los blancos como referencia. Los resultados fueron expresados en porcentaje de lipoperoxidación residual.

Determinación de tioles microsómicos. La medición de los tioles totales se realizó de acuerdo a la técnica descrita por Letelier y cols., 2008 (Letelier M. E., y cols., 2008). Esta técnica cuantifica espectrofotométricamente el TNB liberado en la reacción entre el DTNB y los grupos sulfhidrilos presentes en la muestra. Este compuesto absorbe a 412 nm y su coeficiente de extinción es 13.600 $\text{M}^{-1} \text{cm}^{-1}$ (Figura 4).

Para determinar prevención de la oxidación de los tioles microsómicos, las mezclas de reacción contenían en un volumen de 1,0 mL los reactivos siguientes (concentraciones finales): microsomas (0,5 mg/mL de proteína) suspendidos en amortiguador fosfato 50 mM, pH 7,4; preincubados con los

extractos de palqui durante 15 min en hielo antes de agregar el sistema oxidante. Los blancos contenían todos los reactivos con la única excepción de la proteína microsómica. Añadido el sistema oxidante FeCl_3 600 μM y ascorbato de sodio 1,0 mM, se incubaron muestras y blancos durante 20 min en un baño termostático Julabo SW-21C a 37°C con agitación constante. Al cabo de este período, los tubos que contenían proteína microsómica se centrifugaron a 9.000 g durante 10 min a 4°C en una centrífuga Hermle, modelo Z326K. Posteriormente, se descartó el sobrenadante de los tubos y se resuspendió el *pellet* (microsomas) de las muestras en amortiguador fosfato 50 mM, pH 7,4. A continuación, se agregó DTNB 0,3 mM a las mezclas de reacción y se incubaron nuevamente en baño termostático por 1,0 h a 37°C con agitación constante. Finalmente, las absorbancias de éstas se leyeron a 412 nm en un espectrofotómetro Unicam UV/VIS modelo UV3 acoplado a un computador, utilizando para ello sus blancos respectivos. Los resultados fueron expresados en porcentaje de tioles microsómicos recuperados.

Para determinar reversión de la oxidación de tioles microsómicos, en igual volumen final (1,0 mL) y concentraciones finales, microsomas (0,5 mg/mL de proteína) suspendidos en amortiguador fosfato 50 mM, pH 7,4 se preincubaron con el sistema oxidante FeCl_3 600 μM y ascorbato de sodio 1,0 mM durante 5 min en hielo. Tras la preincubación, se añadieron los extractos de palqui a las mezclas de reacción. Posteriormente, se incubaron muestras y blancos durante 20 min en baño termostático con agitación constante. Los blancos contenían todos los reactivos con la única excepción de la proteína microsómica. Al cabo de este período, los tubos que contenían proteína microsómica se centrifugaron a 9.000 g durante 10 min a 4°C en una centrífuga Hermle, modelo Z326K. Posteriormente, se descartó el sobrenadante de los tubos y se resuspendió el *pellet* (microsomas) de las muestras en amortiguador fosfato 50 mM, pH 7,4. A continuación, se agregó DTNB 0,3 mM a las mezclas de reacción y se incubaron nuevamente en baño termostático por 1,0 h a 37°C con agitación

constante. Finalmente, las absorbancias de éstas se leyeron a 412 nm en un espectrofotómetro Unicam UV/VIS modelo UV3 acoplado a un computador, utilizando para ello sus blancos respectivos. Los resultados fueron expresados en porcentaje de tioles microsómicos recuperados.

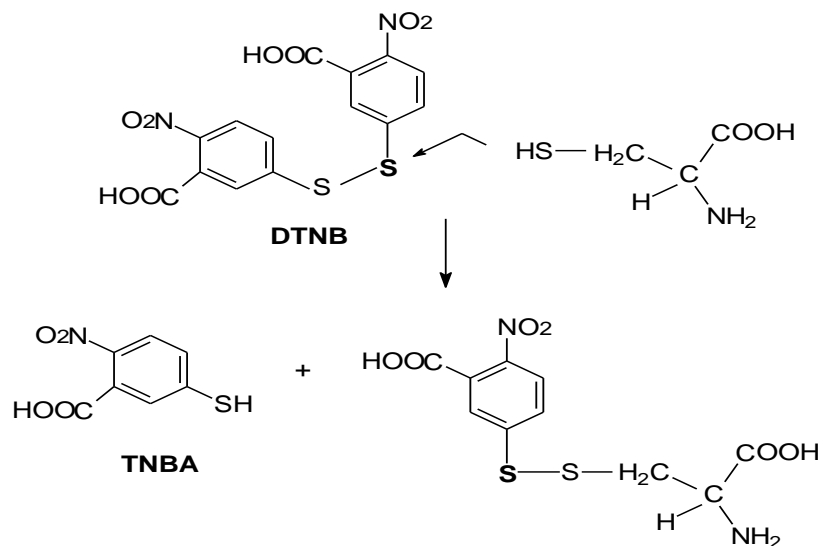


Figura 4. Reacción entre el DTNB y los residuos tiólicos proteicos.

Espectro de absorbancia del Cu²⁺ en presencia de los extractos de palqui.

Para determinar la actividad quelante, se realizó un barrido de una solución de CuSO₄ 0,5 mM entre 200 y 600 nm en ausencia y presencia de los extractos de palqui en estudio. Para realizar el barrido de la solución de CuSO₄ 0,5mM se utilizó buffer fosfato 50mM, pH 7,4 como blanco. Se utilizó el mismo blanco para realizar el barrido de las soluciones de extracto. Asimismo, el blanco correspondiente a las mezclas Cu²⁺/extracto contenía todos los reactivos a excepción del cobre. Las concentraciones de ambos extractos ensayadas fueron: 1,0, 4,0 y 8,0 µL/mL de mezcla. Estos ensayos se realizaron en un espectrofotómetro UV3 Unicam UV-VIS conectado a un computador.

Determinación de Hemoglobina. Muestras de sangre fresca se centrifugaron a 1000 g por 10 min a 4°C. El sobrenadante se descartó y el sedimento se lavó dos veces con 10 volúmenes de amortiguador fosfato salino (PBS), pH 7,4. El plasma y la capa de glóbulos blancos y plaquetas se aspiraron y el sedimento se resuspendió en PBS, pH 7,4 frío en una proporción 1:10 V/V. Suspensiones de glóbulos rojos (1,0 mL conteniendo entre 1,0 y 1,5 millones de células/mL) se incubaron con o sin cantidades crecientes de cada extracto de palqui por 15 min a 4°C. Luego, las muestras se centrifugaron a 1000 g por 10 min a 4°C y se determinó la absorbancia de los sobrenadantes a 550 nm. El contenido de hemoglobina se calculó utilizando el $\epsilon_{550} = 53.412 \text{ M}^{-1} \times \text{cm}^{-1}$ (Gratzer W.B. y Beaven G.H., 1960).

Análisis estadístico. Los datos presentados corresponden al promedio de al menos 4 experimentos independientes \pm DE. La significancia estadística (t-Student) y los análisis de correlación se realizaron usando el software GraphPad Prism 5.0. Las diferencias se consideraron como significativas, cuando $p < 0,05$.

III. RESULTADOS

Polifenoles totales de los extractos de palqui. La Tabla N° 1 muestra el contenido de polifenoles de los extractos en estudio. Catequina fue el polifenol utilizado como estándar. Es por ello que los resultados están expresados en mg equivalentes de catequina/mL de extracto y en η moles equivalentes de catequina/ μ L de extracto. El contenido total de polifenoles mayor le correspondió al extracto acuoso ($14,9 \pm 0,163$ η moles equivalentes de catequina/ μ L de extracto); este contenido fue 4,2 veces mayor que el del extracto hidroalcohólico.

Tabla N° 1. Polifenoles totales.

Extractos	mg equivalentes de catequina/mL	ηmoles equivalentes de catequina/μL
Hidroalcohólico	$1,03 \pm 0,0135$	$3,56 \pm 0,0466$
Acuoso	$4,33 \pm 0,0474$	$14,9 \pm 0,163$

Los valores representan el promedio de al menos 4 experimentos independientes \pm DE.

Prevención de la lipoperoxidación microsómica inducida por el sistema Fe^{3+} /ascorbato en presencia de los extractos de palqui. La Figura 5 muestra las curvas concentración de los extractos *versus* el % de lipoperoxidación residual. En ellas se observa que ambos extractos de palqui fueron capaces de prevenir la lipoperoxidación microsómica de una forma concentración-respuesta. A partir de los datos de la Figura 5, se construyeron las curvas semilogarítmicas que se muestran en la Figura 6. De estas curvas se obtuvieron los EC_{50} que aparecen en la Tabla 2. Los EC_{50} representan la cantidad de extracto que fue capaz de prevenir en un 50% la lipoperoxidación microsómica inducida por el sistema Fe^{3+} /ascorbato. El extracto hidroalcohólico de palqui mostró el menor EC_{50} : 66,0 η moles equivalentes de catequina/0,5 mg proteína microsómica, por lo tanto, el que mostró mayor actividad antilipoperoxidante. El EC_{50} del extracto acuoso fue 870,9 η moles equivalentes de catequina/0,5 mg proteína microsómica; su actividad antilipoperoxidante fue por tanto, 13,2 veces menos potente que la del extracto hidroalcohólico de palqui. Probablemente las propiedades fisicoquímicas de los antioxidantes presentes en ambos extractos son diferentes.

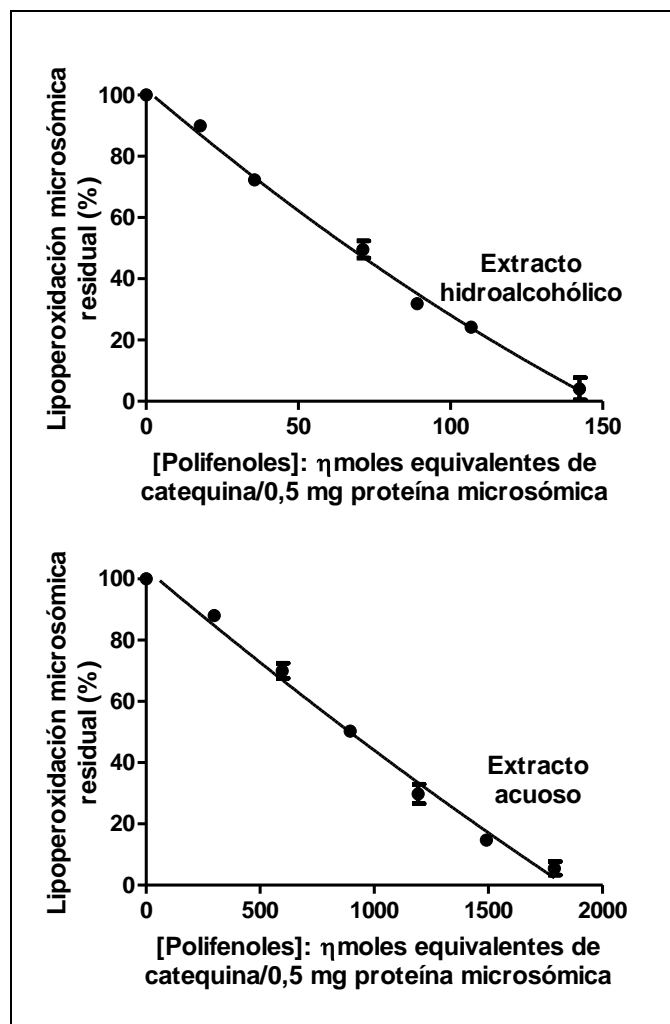


Figura 5. Efecto de los extractos de palqui sobre la prevención de la lipoperoxidación microsómica inducida por el sistema Fe^{3+} /ascorbato. El porcentaje de lipoperoxidación residual fue calculado considerando como 100% los valores obtenidos en presencia del sistema Fe^{3+} /ascorbato y en ausencia del extracto. Los microsomas fueron tratados primero con los extractos herbales y luego con el sistema Fe^{3+} /ascorbato de acuerdo a lo descrito en Métodos. Los valores representan el promedio de al menos 4 experimentos independientes \pm DE. $r^2 = 0,9935$ (extracto hidroalcohólico); $r^2 = 0,9905$ (extracto acuoso).

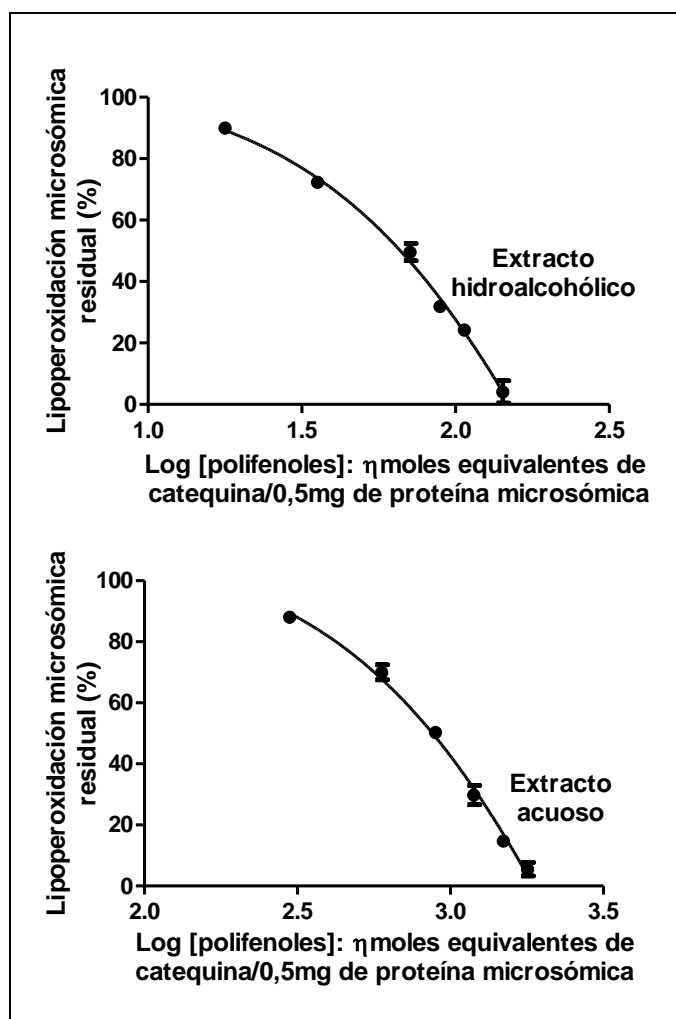


Figura 6. Gráficos semilogarítmicos del efecto de los extractos de palqui sobre la prevención de la liperoxidación microsómica inducida por el sistema Fe^{3+} /ascorbato. El porcentaje de liperoxidación residual fue calculado considerando como 100% aquel obtenido en presencia del sistema Fe^{3+} /ascorbato y en ausencia de extracto. El ensayo de liperoxidación se realizó de acuerdo a lo descrito en Métodos. Los valores representan el promedio de al menos 4 experimentos independientes \pm DE. $r^2 = 0,9923$ (extracto hidroalcohólico); $r^2 = 0,9927$ (extracto acuoso).

Tabla N° 2. Efecto comparativo de los extractos de palqui sobre la prevención de la lipoperoxidación microsómica inducida por el sistema Fe³⁺/ascorbato.

Extractos	EC₅₀
Hidroalcohólico	66,0
Acuoso	870,9

EC₅₀: concentración de extracto expresada en ηmoles equivalentes de catequina/0,5 mg de proteína microsómica que previene en un 50% la lipoperoxidación microsómica inducida por Fe³⁺/ascorbato. Los valores fueron obtenidos de los gráficos semilogarítmicos que aparecen en la Figura 6.

Prevención de la oxidación de tioles microsómicos inducida por el sistema Fe^{3+} /ascorbato en presencia de los extractos de palqui. Los extractos de palqui previnieron la oxidación de tioles microsómicos de una forma concentración-respuesta. En la Figura 7 aparecen las curvas directas de las concentraciones de los extractos *versus* el % tioles microsómicos recuperados. A partir de los valores de la Figura 7, se construyeron las curvas semilogarítmicas que se muestran en la Figura 8. De estas curvas se obtuvieron los EC_{50} que aparecen en la Tabla 3. Los EC_{50} representan la cantidad de extracto que fue capaz de prevenir en un 50% la oxidación de los grupos tiólicos microsómicos inducida por el sistema Fe^{3+} /ascorbato. El extracto hidroalcohólico de palqui mostró el menor EC_{50} : 104,7 η moles equivalentes de catequina/0,5 mg de proteína microsómica, por lo tanto, el que mostró mayor actividad preventiva de la oxidación de tioles. El EC_{50} del extracto acuoso de palqui fue 977,2 η moles equivalentes de catequina/0,5 mg de proteína microsómica, mostrando una actividad preventiva de la oxidación de tioles microsómicos 9,3 veces menor que la del extracto hidroalcohólico de palqui.

Los resultados obtenidos sugieren que las propiedades fisicoquímicas de los principios activos extraídos estarían involucradas en la actividad antioxidante de los extractos herbales.

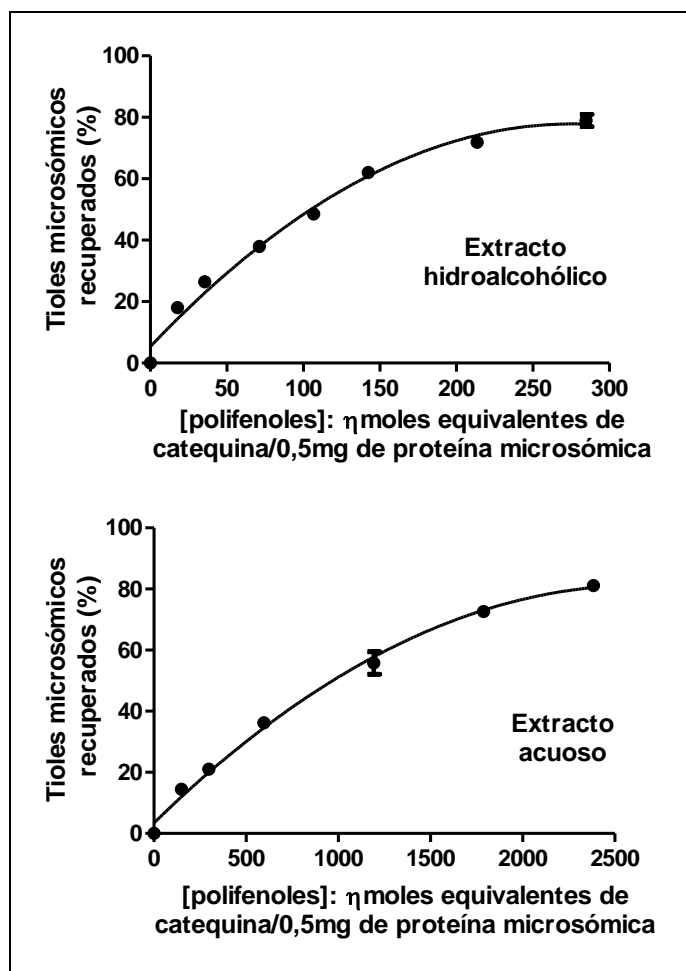


Figura 7. Efecto de los extractos de palqui sobre la prevención de la oxidación de tioles microsómicos inducida por el sistema Fe^{3+} /ascorbato. El porcentaje de tioles microsómicos recuperado fue calculado considerando como 0% aquel obtenido por diferencia entre el total de tioles microsómicos y los tioles no dañados medidos en presencia del sistema pro-oxidante y en ausencia de extracto. El ensayo de prevención de la oxidación de los tioles microsómicos se realizó de acuerdo a lo descrito en Métodos. Los valores representan el promedio de al menos 4 experimentos independientes \pm DE. $r^2=0,9860$ (extracto hidroalcohólico); $r^2=0,9928$ (extracto acuoso).

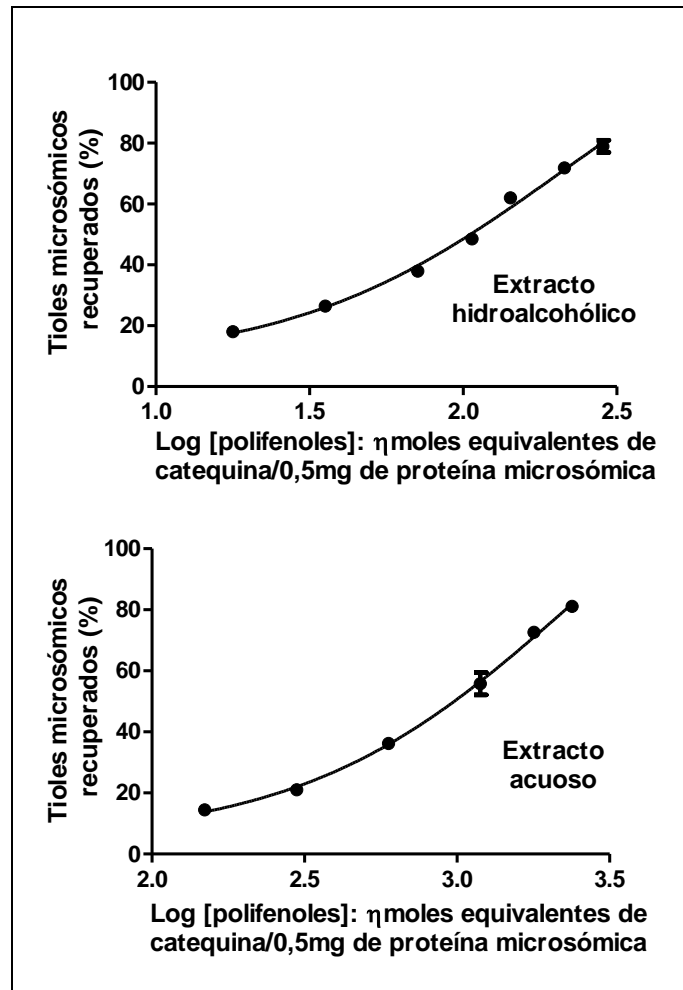


Figura 8. Gráficos semilogarítmicos del efecto de los extractos de palqui sobre la prevención de la oxidación de tioles microsómicos inducida por el sistema Fe^{3+} /ascorbato. Los porcentajes de tioles microsómicos recuperados como también las concentraciones de polifenoles de los extractos corresponden a aquellas de la Figura 8. Los valores representan el promedio de al menos 4 experimentos independientes \pm DE. r^2 0,9917 (extracto hidroalcohólico); r^2 = 0,9940 (extracto acuoso).

Tabla N° 3. Efecto comparativo de los extractos de palqui sobre la prevención de la oxidación de tioles microsómicos inducida por el sistema Fe³⁺/ascorbato.

Extractos	EC₅₀
Hidroalcohólico	104,7
Acuoso	977,2

EC₅₀: concentración de extracto expresada en η moles equivalentes de catequina /0,5 mg de proteína microsómica que previene en un 50% la oxidación de tioles microsómicos inducida por Fe³⁺/ascorbato. Los valores fueron obtenidos de los gráficos semilogarítmicos que aparecen en la Figura 8.

Reversión de la oxidación de tioles microsómicos inducida por el sistema Fe^{3+} /ascorbato en presencia de los extractos de palqui. Los extractos de palqui revirtieron la oxidación de tioles microsómicos de una forma concentración-respuesta. En la Figura 9 aparecen las curvas directas de las concentraciones de los extractos *versus* el % de tioles microsómicos recuperados. A partir de la Figura 9, se construyeron las curvas semilogarítmicas que se muestran en la Figura 10. De estas curvas se obtuvieron los EC_{50} que aparecen en la Tabla 4. Los EC_{50} representan la cantidad de extracto que fue capaz de revertir en un 50% la oxidación de tioles microsómicos inducida por el sistema Fe^{3+} /ascorbato. El extracto hidroalcohólico de palqui mostró el menor EC_{50} : 177,8 μmoles equivalentes de catequina/0,5 mg proteína microsómica, por lo tanto, el que mostró la mayor capacidad para revertir la oxidación de los tioles microsómicos. El EC_{50} del extracto acuoso fue 1949,8 μmoles equivalentes de catequina/0,5 mg proteína microsómica, mostrando una capacidad para revertir la oxidación de los tioles microsómicos 11,0 veces menor que la del extracto hidroalcohólico de palqui.

Los resultados obtenidos parecen indicar que un alto contenido de polifenoles totales no es la única característica implicada en la capacidad de los antioxidantes presentes en los extractos de palqui de reducir los enlaces –S-S- productos de la oxidación de los tioles microsómicos.

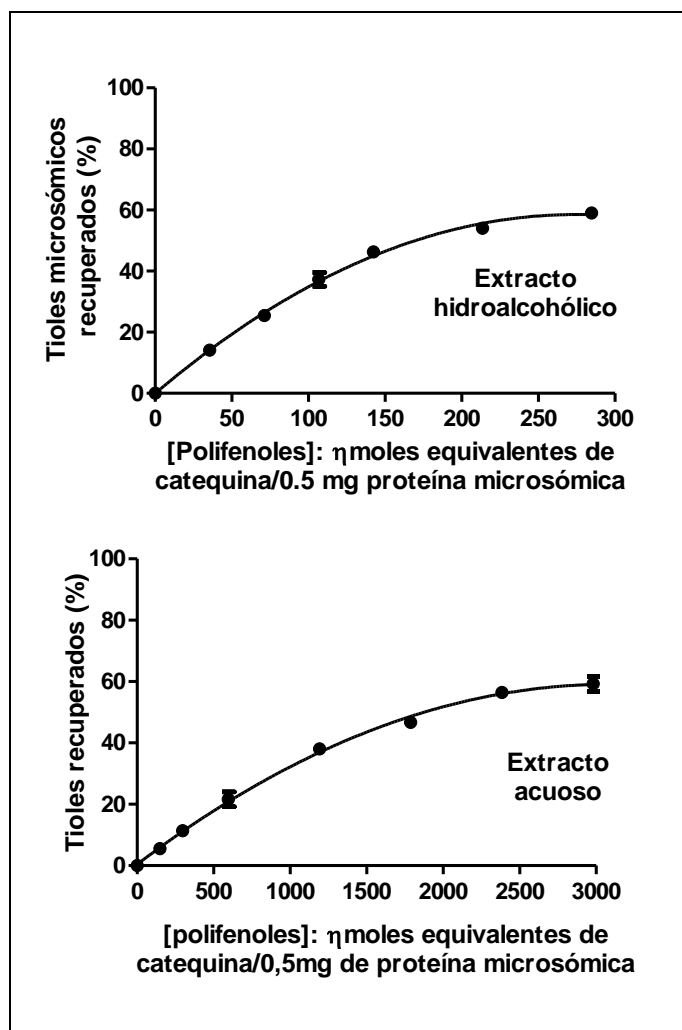


Figura 9. Efecto de los extractos de palqui sobre la reversión de la oxidación de tioles microsómicos inducida por el sistema Fe^{3+} /ascorbato. El porcentaje de tioles microsómicos recuperado fue calculado considerando como 0% aquel obtenido de la diferencia entre el total de tioles microsómicos y los tioles no dañados en presencia del sistema Fe^{3+} /ascorbato y en ausencia de extracto. El ensayo de reversión de oxidación se realizó de acuerdo a lo descrito en Métodos. Los valores representan el promedio de al menos 4 experimentos independientes \pm DE. $r^2 = 0,9953$ (extracto hidroalcohólico); $r^2 = 0,9945$ (extracto acuoso).

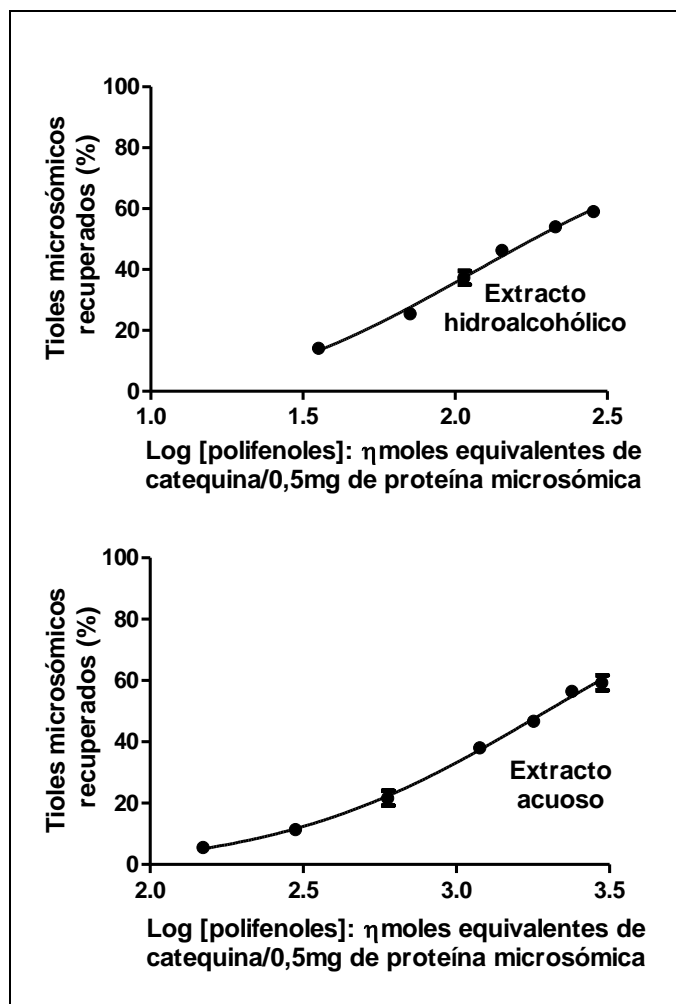


Figura 10. Gráficos semilogarítmicos del efecto de los extractos de palqui sobre la reversión de la oxidación de tioles microsómicos inducida por el sistema Fe^{3+} /ascorbato. El porcentaje de tioles microsómicos recuperados fue calculado considerando como 0% aquel obtenido de la diferencia entre el total de tioles microsómicos y los tioles no dañados en presencia del sistema Fe^{3+} /ascorbato y en ausencia de extracto. El ensayo de reversión de oxidación se realizó de acuerdo a lo descrito en Métodos. Los valores representan el promedio de al menos 4 experimentos independientes \pm DE. $r^2 = 0,9883$ (extracto hidroalcohólico); $r^2 = 0,9927$ (extracto acuoso).

Tabla N° 4. Efecto comparativo de los extractos de palqui sobre la reversión de la oxidación de tioles microsómicos inducida por el sistema Fe³⁺/ascorbato.

Extractos	EC₅₀
Hidroalcohólico	177,8
Acuoso	1949,8

EC₅₀: concentración de extracto expresada en ηmoles equivalentes de catequina /0,5 mg de proteína microsómica que revierte en un 50% la oxidación de tioles microsómicos inducida por Fe³⁺/ascorbato. Los valores fueron obtenidos de los gráficos semilogarítmicos que aparecen en la Figura 10.

Capacidad quelante de Cu^{2+} de los extractos de palqui. La Figura 11a muestra los espectros de absorbancia de una solución de CuSO_4 0,5 mM en ausencia y presencia de distintos volúmenes de extracto hidroalcohólico de palqui. El espectro de absorbancia de la solución de CuSO_4 presentó un pico característico a 200 nm con una absorbancia máxima de 1,358 Unidades de Absorbancia (UA). Al adicionar 1,0 y 4,0 μL de extracto hidroalcohólico de palqui a dicha solución, la absorbancia a 200 nm disminuyó a 1,097 UA y 1,012 UA, respectivamente. Al adicionar 8,0 μL de extracto hidroalcohólico a la solución de CuSO_4 0,5 mM, el pico de absorbancia se desplazó hacia los 210 nm y su absorbancia máxima fue 0,818 UA. El cambio del espectro de absorbancia del Cu^{2+} al adicionar diferentes volúmenes de extracto herbal a una solución de CuSO_4 0,5 mM, es una medida de la existencia de compuestos capaces de quelar metales en dicho extracto.

La Figura 11b muestra los espectros de absorbancia de una solución de CuSO_4 0,5 mM incubados con 1 μL de extracto hidroalcohólico de palqui a diferentes tiempos. Tomando como referencia el espectro del CuSO_4 , al adicionar 1,0 μL de extracto acuoso a la solución de CuSO_4 0,5 mM e incubar la mezcla durante 2, 30 y 60 min, las absorbancias máximas a 200 nm fueron casi idénticas: 1,136 UA; 1,130 UA y 1,097 UA, respectivamente.

La Figura 11c muestra los espectros de absorbancia de una solución de CuSO_4 0,5 mM en ausencia y presencia de distintos volúmenes de extracto acuoso de palqui. Al adicionar 1,0, 4,0 y 8 μL del extracto acuoso de extracto acuoso a la solución de CuSO_4 , el pico característico a 200 nm del Cu^{2+} (1,358 UA) se desplazó a 210 nm con absorbancias máximas similares de 0,862 UA, 0,849 UA y 0,797 UA, respectivamente.

La Figura 11d muestra los espectros de absorbancia de una solución de CuSO_4 0,5 mM incubados con 1 μL de extracto acuoso de palqui a diferentes tiempos. Tomando como referencia el espectro del CuSO_4 , al adicionar 1,0 μL de extracto acuoso a la solución de CuSO_4 0,5 mM e incubar la mezcla durante 2, 30 y 60 min, se observó un desplazamiento del pico a 200 nm hacia 210 nm cuyas absorbancia máximas fueron muy similares: 0,867 UA; 0,797 UA y 0,752 UA, respectivamente.

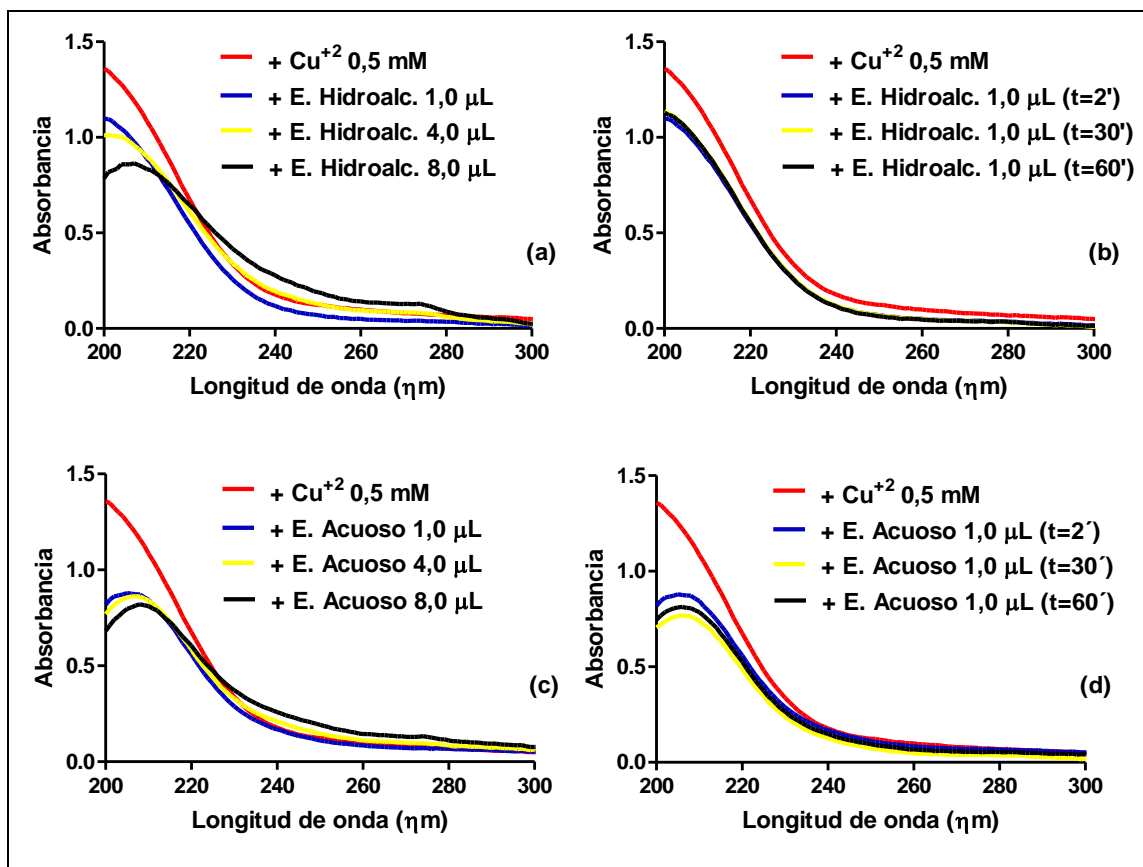


Figura 11. Modificación del espectro de absorbancia de Cu^{2+} en presencia de los extractos de palqui. $[\text{CuSO}_4]$: 0,5 mM. La Figura representa los espectros experimentales obtenidos con volúmenes crecientes de extracto hidroalcohólico y acuoso (11a y 11c), además de los espectros obtenidos a volúmenes constantes y tiempos de incubación variables de ambos extractos de palqui (11b y 11d).

Liberación de hemoglobina de una suspensión de glóbulos rojos en presencia de los extractos de palqui. La liberación de hemoglobina desde una suspensión de glóbulos rojos se utilizó como método para evaluar la capacidad surfactante de los extractos de palqui. La Figura 12 muestra las curvas concentración de los extractos *versus* el % de liberación de hemoglobina. Este porcentaje se calculó considerando como 100% de hemoglobina liberada al proveniente de una suspensión de glóbulos rojos tratados con Tritón X-100 20% p/V. Ambos extractos de palqui fueron capaces de liberar hemoglobina desde la suspensión de glóbulos rojos de una forma concentración-respuesta. A partir de la Figura 12 se construyeron las curvas semilogarítmicas que se muestran en la Figura 13. De estas curvas se obtuvieron los EC_{50} que aparecen en la Tabla 5. Los EC_{50} representan la cantidad de extracto capaz de provocar la liberación de un 50% de la hemoglobina desde la suspensión de glóbulos rojos. El extracto hidroalcohólico de palqui mostró el menor EC_{50} : 38,0 μ L de extracto de palqui/0,5 mL de suspensión de glóbulos rojos, por lo tanto, el que mostró mayor actividad surfactante. El EC_{50} del extracto acuoso fue 326,2 μ L de extracto de palqui/0,5 mL de suspensión de glóbulos rojos; su actividad surfactante fue por tanto, 8,5 veces menos potente que la del extracto hidroalcohólico de palqui. Los resultados presentados muestran que los extractos de palqui fueron capaces de modificar la membrana de los glóbulos rojos en suspensión, en distinta extensión. De esta manera, se confirma la presencia de compuestos tenso-activos en los extractos de palqui, que podrían corresponder a las saponinas descritas.

Cabe destacar que ambos extractos se comportaron como mejores antioxidantes que surfactantes (Tabla 6). Así, el extracto hidroalcohólico fue 2 veces más potente como antioxidante que surfactante y el extracto acuoso, 5,5 veces. Ambas actividades del extracto hidroalcohólico fueron más potentes que

las del extracto acuoso; los EC_{50} de las actividades antioxidantes y aquel de la actividad surfactante obtenidas para el extracto hidroalcohólico fueron menores que los del extracto acuoso. Es importante conocer la relación entre dichas actividades, dado que constituyen una herramienta que permitiría establecer dosis más seguras en preparados de esta planta. Por lo tanto, el control de preparados de palqui orientados a la formulación de fitofármacos respecto de las actividades antioxidante y surfactante, es necesario.

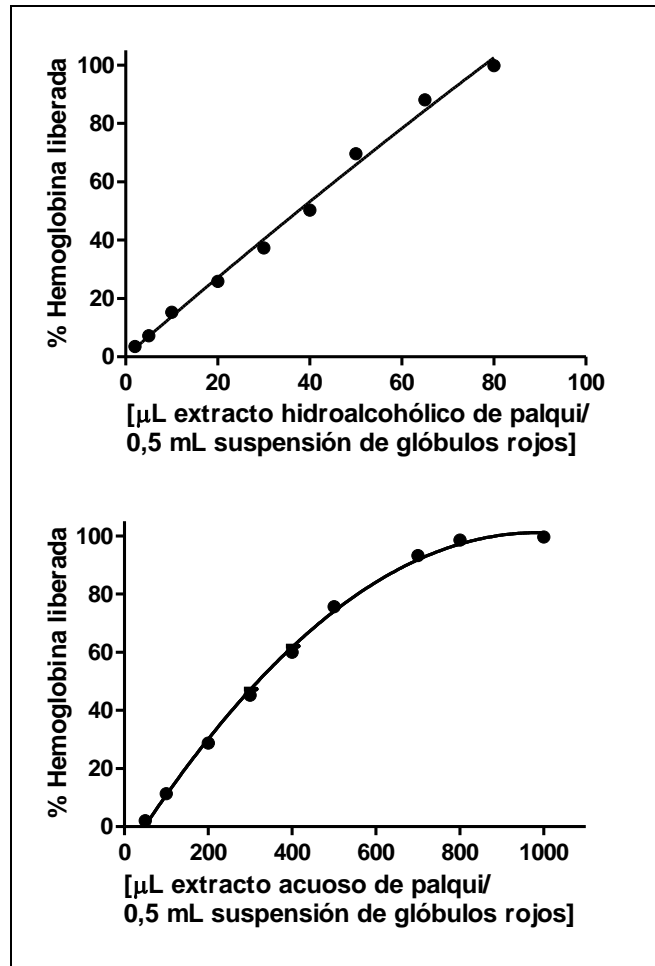


Figura 12. Efectos de los extractos de palqui sobre la liberación de hemoglobina de una suspensión de glóbulos rojos. El porcentaje de hemoglobina liberada fue calculado considerando como 0% aquel obtenido en ausencia de extracto. Tritón X-100 20% p/V fue utilizado para obtener la liberación del 100% de la hemoglobina. El ensayo de determinación de hemoglobina se realizó de acuerdo a lo descrito en Métodos. Los valores representan el promedio de al menos 4 experimentos independientes \pm DE. $r^2 = 0,9935$ (extracto hidroalcohólico); $r^2 = 0,9972$ (extracto acuoso).

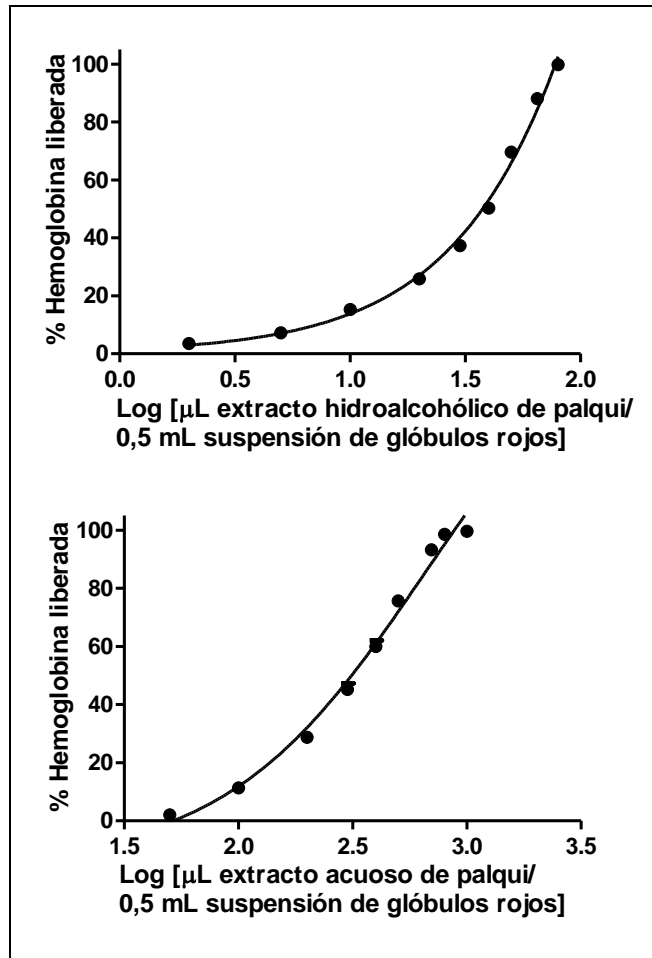


Figura 13. Gráficos semilogarítmicos del efecto de los extractos de palqui sobre la liberación de hemoglobina de una suspensión de glóbulos rojos. El porcentaje de hemoglobina liberada fue calculado considerando como 0% aquel obtenido en ausencia de extracto. Tritón X-100 20% p/V fue utilizado para obtener la liberación del 100% de la hemoglobina. El ensayo de determinación de hemoglobina se realizó de acuerdo a lo descrito en Métodos. Los valores representan el promedio de al menos 4 experimentos independientes \pm DE. $r^2 = 0,9935$ (extracto hidroalcohólico); $r^2 = 0,9886$ (extracto acuoso).

Tabla N° 5. Efecto comparativo de los extractos de palqui sobre la liberación de hemoglobina de una suspensión de glóbulos rojos.

Extractos	EC₅₀
Hidroalcohólico	38,0
Acuoso	326,2

EC₅₀: concentración expresada en µL de extracto de palqui/0,5 mL de suspensión de glóbulos rojos que provoca en un 50% la liberación de hemoglobina desde dicha suspensión. Los valores fueron obtenidos de los gráficos semilogarítmicos que aparecen en la Figura 13. Los valores experimentales representan el promedio de al menos 4 experimentos independientes ± DE.

Tabla N° 6. Efecto comparativo de los extractos de palqui sobre la liberación de hemoglobina de una suspensión de glóbulos rojos y sobre la prevención de la lipoperoxidación microsómica.

Extractos	EC₅₀ liberación hemoglobina	EC₅₀ prevención lipoperoxidación
Hidroalcohólico	38,0	18,8
Acuoso	326,2	59,5

EC₅₀ liberación hemoglobina: concentración de extracto expresada en µL de extracto de palqui/0,5 mL de suspensión de glóbulos rojos que provoca en un 50% la liberación de hemoglobina desde dicha suspensión; EC₅₀ prevención lipoperoxidación: concentración de extracto expresada en µL de extracto de palqui/0,5 mg de proteína microsómica que previene en un 50% la lipoperoxidación microsómica inducida por Fe³⁺/ascorbato.

IV. DISCUSIÓN

Cestrum parqui L'Herit, (n.v. palqui), planta originaria de Sudamérica ha tenido diferentes usos benéficos. La etnomedicina recomienda la infusión de su tallo desprovisto de la corteza como antipirético y sudorífico. Las hojas se emplean para tratar diversas afecciones a la piel (Montes M. y Wilkomirsky T., 1987). Sin embargo, hasta hoy sólo se ha podido establecer científicamente su efecto antiinflamatorio y un discreto efecto antipirético (Backhouse N. y cols., 1996). A pesar de todas estas bondades, se han descrito intoxicaciones agudas en bovinos y ovinos asociadas al consumo de palqui, las cuales se reflejan en hemorragias generalizadas y muerte de los animales intoxicados (Rivero R. y cols., 2011).

Son escasos los estudios científicos relacionados con los efectos benéficos y tóxicos de preparados de palqui. Las saponinas presentes en esta planta podrían ser las responsables de los efectos tóxicos conducentes a hemorragia generalizada en los animales intoxicados. Por otra parte, es un hecho conocido que en general todas las patologías, en mayor o menor grado, están asociadas a estrés oxidativo. Por lo tanto, la presencia de antioxidantes en preparados de palqui podría ayudar a la terapia de diferentes patologías. Como una forma de caracterizar preparados de palqui, dos extractos, uno acuoso y el otro hidroalcohólico fueron analizados respecto de su actividad antioxidante y surfactante.

Actividad antioxidante: se evaluó determinando la capacidad de los extractos de inhibir la oxidación de los lípidos y los tioles proteicos microsómicos presentes en microsomas hepáticos de rata. Además, se determinó su capacidad de quelar metales a través del cambio en el espectro de absorción de iones Cu^{2+} . Estos iones metálicos en su estado libre y reducido reaccionan con el oxígeno molecular generando ROS a través de las reacciones de Haber

Weiss y/o Fenton. La actividad surfactante se determinó midiendo la capacidad de los extractos de provocar la liberación de hemoglobina desde una suspensión de glóbulos rojos.

El extracto acuoso presentó 4,2 veces mayor contenido de polifenoles totales en comparación con el extracto hidroalcohólico. Una mayor o menor extracción de compuestos polifenólicos depende principalmente de las propiedades fisicoquímicas de ellos, así como de la polaridad de los solventes utilizados en el proceso extractivo. El agua es más polar que una mezcla hidroalcohólica, de lo cual se infiere que la droga vegetal, hojas y tallos de la parte aérea de palqui, contiene mayoritariamente polifenoles muy polares. Este postulado se correlaciona con el uso externo que popularmente ha tenido esta planta a través del tiempo, donde polifenoles polares y por lo tanto, no absorbibles, podrían jugar un rol importante en el tratamiento de patologías cutáneas. Como antiinflamatorio tópico, ya ha sido demostrada la eficacia de extractos acuosos y metanólicos de palqui, efecto evaluado determinando la disminución del edema plantar inducido por carragenina en conejillos de indias (Backhouse N. y cols., 1996).

Aunque el contenido de polifenoles fue mayor en el extracto acuoso, la actividad anti-lipoperoxidante microsómica del extracto hidroalcohólico fue 13,2 veces más potente que la del extracto acuoso, diferencia obtenida al comparar los valores de EC_{50} (66,0 *versus* 870,9 η moles equivalentes de catequina/0,5 mg de proteína microsómica). Similar a lo observado en la lipoperoxidación microsómica, el extracto hidroalcohólico fue 9,3 veces más potente que el extracto acuoso en prevenir (EC_{50} = 104,7 *versus* 977,2 η moles equivalentes de catequina/0,5 mg de proteína microsómica), y 11,0 veces más potente en revertir (EC_{50} = 177,8 *versus* 1949,8 η moles equivalentes de catequina/0,5 mg de proteína microsómica), la oxidación de los tioles microsómicos inducida por Fe^{3+} /ascorbato. Esta significativa diferencia en la actividad antioxidante podría

deberse a la menor polaridad de los polifenoles extraídos por la mezcla etanol-agua y que por tanto, deberían tener mayor afinidad por las membranas biológicas que aquellos extraídos en el agua, como también a diferencias en los potenciales redox entre los antioxidantes extraídos en ambos solventes.

Las diferencias observadas entre los EC_{50} de ambos extractos de palqui para prevenir y revertir la oxidación de los tioles proteicos microsómicos podrían estar relacionados con los mecanismos involucrados en ambas reacciones redox. Así, el mecanismo principalmente involucrado en la prevención de la oxidación de los tioles microsómicos sería el atrapamiento de los radicales libres generados por el sistema Fe^{3+} /ascorbato. En cambio, en la reversión de la oxidación de tioles microsómicos estarían involucrados compuestos con un potencial redox capaz de reducir los disulfuros provenientes de la oxidación de los tioles microsómicos. Es necesario hacer notar que por tratarse de extractos polivalentes, además de polifenoles pueden existir otros compuestos reductores, como por ejemplo compuestos tiólicos que podrían contribuir a la actividad antioxidante observada.

Cabe destacar la importancia de la reversibilidad de la oxidación de los grupos tiólicos proteicos. La mayoría de las proteínas tienen en su estructura cisteína, aminoácido tiólico que generalmente está involucrado en la conformación nativa y/o en la expresión de la actividad biológica de ellas. El funcionamiento de muchos procesos fisiológicos de los seres vivos está dado por la homeostasis de los circuitos tiólicos. El grupo tiólico puede ser reversiblemente oxidado a disulfuro (-S-S-), fenómeno redox que puede aumentar o inhibir la actividad biológica de una proteína.

Además del atrapamiento de radicales libres, otro de los mecanismos que contribuye a la capacidad antioxidante celular es la quelación de metales de transición. Estos metales pueden, en su estado reducido, generar ROS. En este

sentido, se evaluó cualitativamente el efecto quelante de Cu^{2+} de los extractos de palqui. Si bien los cambios del espectro de absorbancia del ión Cu^{2+} no cuantifica la capacidad quelante, si nos permite inferir la presencia de compuestos quelantes de metales en los extractos ensayados. Ambos extractos de palqui alteraron el espectro de absorbancia del ión Cu^{2+} (Figura 11). Los posibles compuestos responsables de este efecto podrían incluir polifenoles, tioles y aminas. Estos compuestos tienen una característica común, ellos poseen en su estructura elementos que poseen pares de electrones sin compartir que pueden ceder para atrapar a los iones metálicos. Estos elementos son: oxígeno, azufre y nitrógeno.

Capacidad surfactante. Uno de nuestros postulados dice relación con las hemorragias difusas observadas en animales de pastoreo que ingieren palqui como forraje. Dicho postulado se basa en que la actividad surfactante del palqui provocaría un aumento en la permeabilidad de las membranas biológicas debido a un aumento de su fluidez. Ambos extractos provocaron la liberación de hemoglobina desde una suspensión de glóbulos rojos de una forma concentración-respuesta. Sin embargo, el extracto hidroalcohólico de palqui fue 8,5 veces más potente en causar la liberación de hemoglobina eritrocitaria, por lo tanto, el de mayor actividad surfactante (Figuras 12 y 13). Estos resultados indican la presencia de saponinas en los extractos de palqui, cuyos efectos detergentes sobre las membranas biológicas, serían los responsables de la hemólisis observada y, por ende, de su toxicidad en animales

Extractos de palqui han sido utilizados a través de los años por la población, especialmente para tratar afecciones de la piel y la fiebre; sin embargo, no existen estudios que permitan evaluar posibles efectos tóxicos de las saponinas responsables de la actividad surfactante, así como de compuestos cardiotónicos descritos en preparados de esta planta. Nuevos experimentos están en proceso que permitan formular fitofármacos eficaces y seguros.

V. CONCLUSIONES

Ambos extractos, acuoso e hidroalcohólico de hojas y tallos de la parte aérea de *Cestrum parqui*, presentaron actividad antioxidante y surfactante de una forma concentración-respuesta, aunque en diferente magnitud. Así, el extracto hidroalcohólico fue 13,2 veces más potente antilipoperoxidante que el extracto acuoso; asimismo, fue 9,3 veces más potente en prevenir la oxidación de tioles microsómicos, y 11,0 veces más potente, en revertir este fenómeno. Por otra parte, el efecto surfactante del extracto hidroalcohólico fue 8,5 veces mayor.

VI. PROYECCIONES

Estos resultados muestran que, además de los usos tradicionales del palqui, podrían formularse preparados con actividad mucolítica. Para ello, se hacen necesarios estudios previos de toxicidad que permitan contar con extractos seguros y eficaces, es decir, que posean concentraciones de saponinas y de compuestos cardiotónicos no tóxicas.

VII. REFERENCIAS

- Backhouse N., Delporte C., Negrete R., Salinas P., Pinto A., Aravena S., Cassels B. K. (1996). Antiinflammatory and antipyretic activities of *Cuscuta chilensis*, *Cestrum parqui* and *Psoralea glandulosa*. *Int. J. Pharmacogn.* 34: 53-57.
- Banerjee R. (2008). *Redox biochemistry*. Wiley-Interscience, Hoboken, N.J. A John Wiley & Sons, Inc., Publication.
- Barbouche N., Hajjem B., Lognay G., Ammar M. (2001). Contribution to the study of the biological activity of *Cestrum parqui* L'Hérit. extracts against the locust *Schistocerca gregaria*. *Biotechnol. Agron. Soc. Environ.* 5: 85-90.
- Benzie I. F. (2000) Evolution of antioxidant defence mechanisms. *Eur. J. Nutr.* 39: 53-61.
- Bors W., Michel C. (2002) Chemistry of the antioxidant effect of polyphenols. *Ann. N. Y Acad. Sci.* 957: 57-69.
- Brevis C., Quezada M., Sierra M. (1999). Lesiones observadas en intoxicaciones accidentales con *Cestrum parqui* (L'Herit) en bovinos. *Arch. med. vet.*, 31:109.
- Brosnan J. T. and Brosnan, M. E. (2008). Glutathione and the Sulfur-Containing Amino Acids: An Overview, in *Glutathione and Sulfur Amino Acids in Human Health and Disease* (eds R. Masella and G. Mazza), John Wiley & Sons, Inc., Hoboken, NJ, USA. doi: 10.1002/9780470475973.ch1.
- Bruneton J. (2001). *Farmacognosia, fitoquímica, plantas medicinales*. 2ª edición, Zaragoza: Acribia. 3: 663-670. ISBN: 84-200-0956-3.

El-Shemy H. (2013). Soybean Bio-Active Compounds. Ed. Intech. 17: 395-397. ISBN 978-953-51-0977-8.

Chaieb I., Boukamcha H., Jannet M., Ben Halima M., Hamouda B., Mighri Z. (2007). Purification of a natural insecticidal substance from *Cestrum parqui* (*Solanaceae*). Pak. J. Biol. Sci., 10: 3822-3828.

Cheeke P. R. (2000). Actual and potential applications of *Yucca schidigera* and *Quillaja saponaria* saponins in human and animal nutrition. Saponins in food, feedstuffs and medicinal plants. Pr. Phyt. Soc. 45: 241-254.

Pearce C., Skelton N., Naylor S., Kanaan R., Kelland J., Oelrichs P., Sanders J., Williams D. (1992). Parquin and carboxyparquin, toxic kaurene glycosides from the shrub *Cestrum parqui*. J. Chem. Soc., Perkin Trans. 1: 593-600.

De Gara L., Locato V., Dipierro S., De Pinto M. (2010). Redox homeostasis in plants. The challenge of living with endogenous oxygen production. Respir. Physiol. Neurobiol. 173: 13-19.

Deneke S. M. (2000). Thiol-based antioxidants. Curr. Top. Cell. Regul. 36: 151-180.

Fraga C. G., Galleano M., Verstraeten S. V., Oteiza P. I. (2010). Basic biochemical mechanisms behind the health benefits of polyphenols. Mol. Aspects. Med. 31: 435-445.

Gratzer W. B., Beaven G. H. (1960). Transparent starch gels: preparation, optical properties and application to haemoglobin characterisation, Clin. Chim. Acta. 5: 577-82.

Jones D. P. (2008). Radical-free biology of oxidative stress. Am. J. Physiol. Cell. Physiol. 295: 849-868.

Klaassen C. D., Reisman S. A. (2010). Nrf2 to the rescue: effects of the antioxidative/electrophilic response on the liver. *Toxico. Appl. Pharmacol.* 244: 57-65.

Kornas A., Kuzniak E., Slesak I., Miszalski Z. (2010). The key role of the redox status in regulation of metabolism in photosynthesizing organisms. *Acta. Biochim. Pol.* 57: 143-151.

Lacaille Dubois M. A., Wagner H. (1996). A review of the biological and pharmacological activities of saponins. *Phytomedicine.* 2(4): 363-386.

Letelier M. E., Lepe A., Faundez M., Salazar J., Marin R., Aracena P., Speisky H. (2008). Possible mechanisms underlying copper-induced damage in biological membranes leading to cellular toxicity, *Chembioint.* 151: 71-82.

Letelier M. E., Cortés J., Lepe A. M., Jara J., Molina-Berrios A., Rodriguez C., Iturra-Montecinos P., Faúndez M. (2009). Evaluation of the antioxidant properties and effects on the biotransformation of commercial herbal preparations using rat liver endoplasmic reticulum. *BLACPMA.* 8(2): 110-120.

Letelier M. E. (2010). Comparative effects of superoxide anion and hydrogen peroxide on microsomal and cytosolic glutathione S-transferase activities of rat liver. *Biol. Trace. Elem. Res.* 134: 203-211.

Lowry O. H. (1951). Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 265-275.

Mc Lennan M. W., Kelly W. R. (1984). *Cestrum parqui* (green cestrum) poisoning in cattle. *Aust. Vet. J.* 61: 289- 291.

Montes M., Wilkomirsky T. (1987). *Medicina Tradicional Chilena*. Editorial de la Universidad de Concepción, Chile. 19-26.

Newcomb M., Chandrasena R. E. (2005). Highly reactive electrophilic oxidants in cytochrome P450 catalysis. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 338: 394-403.

Rivero R., Riet-Correa F., Dutra F., Matto C. (2011). Toxic Plants and Mycotoxins Affecting Cattle and Sheep in Uruguay. *Poisoning by Plants, Mycotoxins and Related Toxins*. 2: 25. (H ISBN 9781845938338).

Schafer F. Q., Buettner G. R. (2001). Redox environment of the cell as viewed through the redox state of the glutathione disulfide/glutathione couple. *Free Radical Bio. Med.* 30: 1191-1212.

Sies H. (2010). Polyphenols and health: update and perspectives. *Arch. Biochem. Biophys.* 501: 2-5.

Wouters M. A., Fan S. W., Haworth N. L. (2010). Disulfides as redox switches: from molecular mechanisms to functional significance. *Antioxid. Redox. Signal.* 12: 53-91.

Wu G., Fang Y. Z., Yang S., Lupton J. R., Turner N. D. (2004). Glutathione metabolism and its implications for health. *J. Nutr.* 134: 489-492.