



UNIVERSIDAD DE CHILE

FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS Y FARMACÉUTICAS

DEPARTAMENTO DE QUÍMICA FARMACOLÓGICA Y TOXICOLÓGICA

LABORATORIO DE FARMACOLOGÍA Y TOXICOLOGÍA

**Capacidad antioxidante de extractos secos provenientes de berries:
maqui (*Aristotelia chilensis*), murtilla (*Ugni molinae*) y arándano
(*Vaccinium corymbosum*)**

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

FRANCISCO ALFREDO ORMAZÁBAL CHAMORRO

Santiago de Chile

2014

Dedicada a mis padres Rosa y José y a mis hermanos Nataly y Tomás.

*"El futuro tiene muchos nombres.
Para los débiles es lo inalcanzable.
Para los temerosos, lo desconocido.
Para los valientes es la oportunidad."*

AGRADECIMIENTOS

Estoy infinitamente agradecido de todo el esfuerzo realizado por mis padres Rosa y José para que yo pudiera cumplir las metas que me propuse. Gracias por todo el amor que me han entregado, sin el apoyo incondicional de ustedes yo no estaría terminando mi carrera.

Agradecer a mis hermanos Nataly y Tomás por estar siempre que los he necesitado.

A mis tíos Juan Luis, Marianela y Herminia por el apoyo y cariño entregado.

Hugo y a Andrea, gracias por todos los buenos momentos que vivimos y por los malos que superamos.

Agradecer a Sebastián, por su incondicional ayuda y apoyo durante toda la carrera.

Gladys y Paulina, gracias por haber aparecido en mi vida y por estar siempre preocupadas de todo lo que me pasaba.

Gracias a Wilson, Óscar, María, Carola, Carlos, Aída Christopher, Andrea, Daniela y Panchuco por la compañía.

Gracias al Dr. Mario Faúndez por el tiempo dedicado.

Agradecer a don José por toda la ayuda entregada en el laboratorio.

Y por último agradecer a la Profesora María Eugenia Letelier que siempre confió en mí. Gracias por la oportunidad que me dio de trabajar en su laboratorio.

ABREVIATURAS

DTNB	: Ácido 5,5'-ditio-bis (2-nitrobenzoico)
GSH	: Glutación transferasa
ROS	: Sustancias reactivas de oxígeno
TBA	: Ácido tiobarbitúrico
TBARS	: Sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico
TCA	: Ácido tiocloroacético
UA	: Unidades de absorbancia

ÍNDICE GENERAL

	Página
PORTADA	I
DEDICATORIA	II
AGRADECIMIENTOS	III
ABREVIATURAS	IV
INDICE GENERAL	V
INDICE DE FIGURAS	VII
INDICE DE TABLAS	VIII
RESUMEN	IX
ABSTRACT	X
I. INTRODUCCIÓN	1
Capacidad antioxidante celular	1
Berries y su capacidad antioxidante	3
<i>Aristotelia chilensis</i> (maqui)	6
<i>Ugni molinae</i> (murtilla o murta)	6
<i>Vaccinium corymbosum</i> (arándano)	7
HIPÓTESIS	8
OBJETIVO GENERAL	8
OBJETIVOS ESPECÍFICOS	8
II. MATERIALES Y MÉTODOS	9

Reactivos.	9
Animales de experimentación.	9
Preparación de microsomas hepáticos de rata.	9
Cuantificación de polifenoles.	10
Condiciones oxidativas.	11
Lipoperoxidación microsómica.	11
Determinación de tioles microsómicos.	12
Quelación de Cu ²⁺	13
Análisis estadístico.	13
III. RESULTADOS	14
Polifenoles totales de los extractos de berries	14
Prevención de la lipoperoxidación microsómica inducida por el sistema Fe ³⁺ /ascorbato en presencia de los extractos de berries	15
Prevención de la oxidación de tioles microsómicos inducida por el sistema Fe ³⁺ /ascorbato	20
Reversión de la oxidación de tioles microsómicos inducida por el sistema Fe ³⁺ /ascorbato	24
Capacidad quelante de Cu ²⁺ de los diferentes extractos	28
IV. DISCUSIÓN	30
V. CONCLUSIONES	34
VI. REFERENCIAS	35

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura N°

Página

1	Estructura química de los compuestos antocianos	4
2	Imágenes de los frutos de los berries	5
3	Estructura química de catequina	10
4	Formación del conjugado para medir TBARS	11
5	Lipoperoxidación microsómica inducida por el sistema Fe ³⁺ /ascorbato en presencia de los extractos de berries.	16
6	Gráficos semilogarítmicos de la lipoperoxidación microsómica inducida por el sistema Fe ³⁺ /ascorbato en presencia de los extractos de berries	17
7	EC ₅₀ de la lipoperoxidación microsómica versus la concentración de polifenoles de los extractos	19
8	Prevención de la oxidación de tioles microsómicos inducida por el sistema Fe ³⁺ /ascorbato en presencia de los extractos de berries	21
9	Gráficos semilogarítmicos de la prevención de la oxidación de los tioles microsómicos inducido por el sistema Fe ³⁺ /ascorbato en presencia de los extractos de berries	22
10	Reversión de la oxidación de tioles microsómicos inducida por el sistema Fe ³⁺ /ascorbato en presencia de los extractos de berries	25
11	Gráficos semilogarítmicos de la reversión de la oxidación de los tioles microsómicos inducido por el sistema Fe ³⁺ /ascorbato en presencia de los extractos de berries	26

12	Modificación del espectro de absorbancia de Cu ²⁺ en presencia de los extractos de berries	29
----	---	----

ÍNDICE DE TABLAS

TABLA N°		Página
1	Polifenoles totales.	14
2	Efecto comparativo de los extractos de berries sobre la prevención de la lipoperoxidación microsómica inducida por el sistema Fe ³⁺ /ascorbato.	18
3	Efecto comparativo de los extractos de berries sobre la prevención de la oxidación de tioles microsómicos inducida por el sistema Fe ³⁺ /ascorbato.	23
4	Efecto comparativo de los extractos de berries sobre la reversión de la oxidación de tioles microsómicos inducida por el sistema Fe ³⁺ /ascorbato.	27

RESUMEN

Capacidad antioxidante de extractos secos provenientes de berries: Arándano, Murtilla y Maqui

Maqui (*Aristotelia chilensis*), murtilla (*Ugni molinae*) y arándano (*Vaccinium corymbosum*) son berries originarios de Chile, Sudamérica y Norteamérica, respectivamente. Han sido utilizados en alimentos funcionales y fitofármacos por su reconocido poder antioxidante, además de tener propiedades antiinflamatorias y antibacterianas. Para medir la actividad antioxidante de extractos vegetales, principalmente se utilizan compuestos sintéticos. Estos compuestos son xenobióticos para la célula animal, y por lo tanto sus potenciales redox no son comparables con los de los antioxidantes biológicos. Es por esto que en este trabajo se estudió la capacidad antioxidante de estos berries utilizando microsomas hepáticos de rata como sistema biológico y como sistema prooxidante, Fe^{3+} /ascorbato. Inicialmente, se midió la cantidad de polifenoles de los tres extractos para ser usada como parámetro comparativo entre ellos. Los tres extractos previnieron la lipoperoxidación de los microsomas, y revirtieron y previnieron la oxidación de los tioles microsómicos con distinta potencia, todas reacciones inducidas por el sistema pro oxidante Fe^{3+} /ascorbato. Todos los extractos además, fueron capaces de quelar el ion Cu^{2+} . El extracto de maqui mostró la mayor actividad antioxidante, y el extracto de arándano, la menor. La calidad y cantidad de los antioxidantes presentes en los diferentes extractos podría explicar esta diferencia. Cabe destacar que extractos polivalentes como los ensayados ejercen su poder antioxidante por diversos mecanismos actuando de manera sinérgica. Esta característica representa una gran ventaja al formular fitofármacos orientados al tratamiento de patologías asociadas a estrés oxidativo.

ABSTRACT

Antioxidant capacity of dry extracts from berries: Blueberry, Murtilla and Maqui.

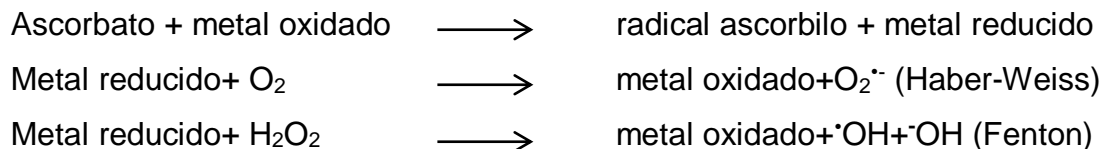
Maqui (*Aristotelia chilensis*), murtilla (*Ugni molinae*) y Arándano (*Vaccinium corymbosum*) are berries from Chile, Southamerica and Northamerica, respectively. They have been used in functional foods and herbal medicine because of their recognized antioxidant power and anti-inflammatory and antibacterial properties. Antioxidant activities of herbal extracts are determined using principally synthetic compounds. These compounds are xenobiotic for the animal cell, thus theirs redox potentials are not comparable with those of biological antioxidants. This is the reason why the antioxidant capacity from these berries was studied. Rat liver microsomes were used as a biological system and Fe^{3+} /ascorbate, as prooxidant system. Initially, the amount of polyphenols in the three extracts was measured in order to be used as a comparative parameter among them. Our request involved that the three extracts prevented microsomal lipoperoxidation and reverted and prevented the oxidations of microsomal thiols with different potency, all reactions induced by Fe^{3+} /ascorbate). They were also able to chelate ion Cu^{+2} . Maqui extract showed the highest antioxidant capacity and the lowest corresponding to the arandano extract. The quality and quantity of the antioxidants present in each one of the three extracts could explain this difference. These polyvalent extracts should exert its antioxidant power by diverse mechanisms acting in a synergic way. This characteristic represent a great benefit for therapies related with pathologies specially associated to oxidative stress.

I. INTRODUCCIÓN

Los seres vivos están expuestos al medioambiente, el que puede requerir diferentes respuestas del organismo. Así, existen condiciones medioambientales que pueden desencadenar en el organismo la producción de especies reactivas del oxígeno (EROs). Si la concentración de EROs sobrepasan la capacidad celular de anular su reactividad, estas especies se tornan tóxicas, fenómeno conocido como estrés oxidativo. [1,2]

Capacidad antioxidante celular

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 a peróxido de hidrógeno el radical anión superóxido ($O_2^{\cdot-}$); la catalasa, que convierte el peróxido de hidrógeno en H_2O y O_2 y; la glutatión transferasa (GSH)-peroxidasa, que transforma los peróxidos a alcoholes. Los mecanismos no enzimáticos están representados por: GSH, las vitaminas E, A y C, y β -caroteno. GSH es el antioxidante celular más abundante, se encuentra en concentraciones mM en la célula [1,2]. Las plantas poseen además de los mecanismos antes descritos, metabolitos de tipo polifenólicos que las protegen de la radiación solar UV, los que son especialmente abundantes en sus hojas [3,4]. 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 [3-8].



Si bien existen similitudes en los mecanismos antioxidantes de compuestos polifenólicos y tiólicos, también existen diferencias en los mecanismos redox de ellos. Así, la oxidación de las biomoléculas tiólicas puede ser revertida por agentes antioxidantes tiólicos, pero no la de los polifenoles [6-8]. En todo tipo de células, esta reversibilidad es el resultado de mecanismos enzimáticos concertados que involucran el uso del tripéptido GSH [9,10]. El estado redox de los sistemas tiólicos que son sensibles a oxidantes no-radicalarios, son controlados por las tiorredoxinas (Trx), GSH y cisteína [11,12]. Los sistemas regulados por las tiorredoxinas y el GSH se mantienen en la célula 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 [12,13].

Una hipótesis complementaria se ha propuesto postulando que el estrés oxidativo puede ocurrir sin la presencia de radicales libres del oxígeno [14]. Los compuestos polifenólicos y tiólicos, además de participar en reacciones redox, pueden actuar como agentes nucleofílicos [6-8,9-10]. Como tales, ellos forman aductos covalentes con metabolitos electrofílicos. A nivel celular, los metabolitos electrofílicos son altamente reactivos y, por lo 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. Los metabolitos electrofílicos u oxidantes no-radicalarios, que incluyen peróxidos, aldehídos, quinonas y epóxidos, son generados enzimáticamente de precursores endógenos y exógenos; ellos no requieren intermediarios radicalarios para oxidar compuestos tiólicos celulares [11]. Los compuestos electrofílicos pueden ser

generados además, como productos de la biotransformación de xenobióticos, entre ellos los fármacos y componentes de los contaminantes ambientales [11]. Si estos compuestos se generan en forma aberrante, su unión a biomoléculas podría provocar como consecuencia: alteración de las funciones biológicas de ellas y de los circuitos tiólicos. 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 [13]. Más aún, los tioles de bajo peso molecular, GSH y cisteína, pueden actuar como agentes quelantes de iones metálicos, lo que también podría ocurrir con los grupos tiólicos redox sensibles de proteínas, alterando su función [14,15]. En este sentido, los compuestos tiólicos parecen ser agentes nucleofílicos más eficientes que los polifenoles [7,13].

De estos antecedentes se concluye que el estrés oxidativo 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 [16]. El estrés oxidativo inducido a través de los circuitos tiólicos parece ser más importante que el generado por las EROs [11]. 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 ADN (ej. Nrf2, NFκβ), activación de receptores (ej. integrina αIIβ3 en la activación de plaquetas), etc. [11]. Más aún, el envejecimiento y las enfermedades relacionadas con este, se asocian a la interrupción de la función y la homeostasis de los circuitos tiólicos [11].

Berries y su capacidad antioxidante

Los berries son frutos carnosos que se caracterizan por poseer un alto contenido de compuestos antocianos. Estos compuestos son glicósidos de polihidroxi y polimetoxi derivados de 2-fenilbenzopirilo o sales de flavilo. Se diferencian entre

sí por el número de grupos hidroxilos, la naturaleza de los azúcares unidos a la molécula, la posición de las uniones y la naturaleza y número de ácidos alifáticos o aromáticos unidos a los azúcares de la molécula. Solo 6 compuestos antocianos son los encontrados mayoritariamente en las plantas; ellos son: pelargonidina (pg), peonina (pn), cianidina (cy), malvidina (mv), y delphinina (dp). [17]

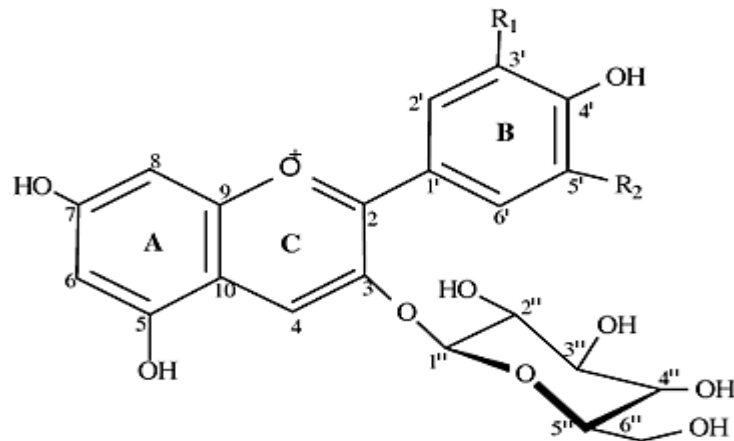


Figura 1. Estructura química de los compuestos antocianos. Dp (1, R1=H, R2=H); Cy 3-glu (3, R1=OH, R2=H); Pg 3-glu (5, R1=H, R2=H); Pn 3-glu (6, R1=OCH3, R2=H); Mv 3 glu (7, R1=OCH3, R2=OCH3)

Los compuestos antocianos son colorantes naturales del tipo flavonoides, los que están presentes particularmente en flores y berries. Estos compuestos pueden actuar como antioxidantes debido a su capacidad de interactuar con especies radicalarias mediante la donación de electrones o hidrógenos, o bien atrapándolos [18-19]. El consumo de alimentos vegetales ricos en antocianos se asocia con un menor riesgo de enfermedades crónicas, tales como cáncer y enfermedades cardiovasculares, efecto que se relaciona con la alta concentración de polifenoles de alta actividad antioxidante [20]. Diversos estudios

muestran que los antocianos presentan además, actividad antimicrobiana que ha sido probada frente a patógenos de importancia clínica, tales como cepas de *Salmonella*, *Staphylococcus*, *Streptococcus*, *Pseudomonas*, *Neisseria*, entre otras [21–23]. Los antocianos pueden también prevenir mutaciones del ADN, presentar actividad estrogénica, impulsar la producción de citoquinas, presentar actividad antiinflamatoria, inhibir la lipoperoxidación y disminuir la permeabilidad y fragilidad capilar [17].

Dentro de los berries de importancia en Chile, encontramos la murtila (*Ugni molinae*), el maqui (*Aristotelia chilensis*) y el arándano (*Vaccinium corymbosum*) los que han sido tradicionalmente utilizados por la población autóctona para el tratamiento de heridas e infecciones asociadas [24]. Al respecto, existen estudios que relacionan la presencia de antocianos en estos berries con su actividad antiinflamatoria, antioxidante y antimicrobiana [20, 24-29].



Figura 2. Imágenes de los frutos de arándano, maqui y murtilla, respectivamente.

***Aristotelia chilensis* (maqui).**

Es un arbusto de hoja perenne, nativo de Sudamérica que pertenece a la familia Elaeocarpaceae y produce pequeños frutos de color púrpura/negro. El intenso color rojo de los extractos acuosos de este fruto es debido a la presencia de antocianinas. Estudios previos dicen que las hojas del maqui poseen alcaloides indólicos y quinolínicos. En cambio el fruto posee principalmente antocianinas, delphinidinas y glucósidos de cianidina. [25]. Se ha prestado especial atención a las antocianinas presentes en los frutos, no solo por su uso como colorante natural, sino que también por sus potenciales efectos benéficos en la salud humana. Así, los berries se han utilizado como suplementos alimenticios en alimentos funcionales. Además, se han descrito efectos potenciales como por ejemplo: actividad anti-aterogénica, inhibición del virus VIH, prevención de problemas visuales y actividad contra algunos tipos de leucemia humana y carcinoma de colon humano [30].

***Ugni molinae* (murtilla o murta)**

Es un arbusto salvaje que crece en la costa y en la precordillera de Chile, entre las VII y IX regiones [31]. Las infusiones de las hojas han sido tradicionalmente usadas para tratar dolores del tracto urinario, como astringentes, estimulantes y fitoestrogénicos. Recientemente, han aparecido varios estudios acerca de las propiedades antiinflamatorias y antioxidantes de los extractos de hojas de murtilla. Algunos compuestos fenólicos han mostrado tener actividad antibacteriana contra un alto espectro de microorganismos. En muchos de estos estudios, las propiedades benéficas de esta planta, han sido atribuidas a la presencia de polifenoles [28].

***Vaccinium corymbosum* (arándano)**

La producción mundial del fruto de esta planta llegó a ser la segunda más importante después de la frutilla. La principal razón se debe a sus altos beneficios en la salud humana, en particular, en la protección del sistema nervioso, la capacidad para revertir el deterioro de la función neural y cognitiva y sus propiedades antioxidantes y antibacterianas [33]. Se han identificado las pro-antocianidinas como los constituyentes químicos responsables de impedir la adherencia de determinados tipos de *Escherichia coli*, asociados a infecciones del tracto urinario, a las células uroepiteliales. Además, se ha demostrado *in vitro*, que estos compuestos impiden la adherencia de *Helicobacter pylori* microorganismo asociado a la incidencia de úlceras gastroduodenales, como también la adherencia de determinados tipos de bacterias asociadas a la placa dental y la gingivitis [34]. La capacidad antioxidante de antocianidinas se ha demostrado a través de su capacidad de inhibir la oxidación *in vitro* de las LDL humanas. El consumo de polvo de zumo de arándano también ha dado como resultado la reducción *in vivo* del colesterol total y LDL en un modelo animal [34].

Los antecedentes presentados muestran que los frutos también llamados berries de las 3 plantas mencionadas presentan actividad antioxidante. Sin embargo, esta propiedad ha sido determinada preferentemente a través de técnicas que no utilizan sistemas biológicos, sino, compuestos sintéticos. Considerando un uso farmacológico de preparados de estos berries, es que en este trabajo se comparó la actividad antioxidante de ellos utilizando como sistema biológico, microsomas hepáticos de rata, preparación experimental enriquecida en retículo endoplásmico. Como sistema pro-oxidante, se utilizó Fe^{3+} /ascorbato, dada la importancia de la actividad quelante que las antocianidinas podrían tener, evitando así la presencia de estos iones metálicos en su estado libre pueden unirse a proteínas y ácidos nucleicos afectando su estructura y función biológica.

HIPÓTESIS

“Extractos secos de berries provenientes de los frutos de Ugni molinae, Aristotelia chilensis y Vaccinium corymbosum tienen capacidad antioxidante”

OBJETIVO GENERAL

Caracterizar extractos de maqui, murtila y arándano en cuanto a su actividad antioxidante.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Determinar la concentración total de polifenoles de los preparados secos de berries.
2. Determinar la capacidad de los preparados 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. Determinar espectrofotométricamente la capacidad quelante de metales a través de la modificación del espectro de absorbancia del ion Cu^{2+} .

II. MATERIALES Y MÉTODOS

Reactivos

Albúmina sérica de bovino, CuSO_4 , Catequina [(+)-cianidol-3,(2*R*,3*S*)-2-(3,4-dihidroxifenil)-3,4-dihidro-1(2*H*)-benzopiran-3,5,7-triol], reactivo de Folin-Ciocalteu, ascorbato de sodio, ácido 5,5'-ditio-*bis*(2-nitrobenzoico) (DTNB), cloruro férrico, se obtuvieron de Sigma-Aldrich. El resto de los reactivos utilizados fueron del mejor grado analítico.

Los 3 preparados de berries fueron donados por Laboratorios Nutrpharm (Santiago, Chile). En Anexos se entrega la información acerca de las características de cada extracto, la cual fue enviada por la empresa.

Animales de experimentación

Se utilizaron ratas macho adultas de la cepa Sprague Dawley, de tres meses de edad y de un 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 la misma Facultad.

Preparación de microsomas hepáticos de rata

Esta fracción subcelular fue preparada de acuerdo a Letelier y cols., 2010 [35]. 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 fueron realizados a 4°C, y todas las

centrifugaciones fueron realizadas usando ya sea una centrifuga con refrigeración Hermle modelo Z326K o una ultracentrífuga Beckman modelo XL-90. El tejido hepático (9-11g 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 15min y el sedimento fue descartado. El sobrenadante obtenido fue centrifugado a 105.000 g por 60min. El *pellet* (microsomas) fue almacenado a -80 °C en un *freezer* il-Shin modelo DF8514 por hasta 3 meses. La cuantificación de la proteína microsómica se determinó por el método de Lowry y cols., 1951 [36], utilizando albúmina sérica de bovino (fracción IV) como estándar.

Cuantificación de Polifenoles

La determinación de polifenoles totales se realizó de acuerdo al método de Letelier y cols. (2009) [37]. Este método utiliza catequina como estándar.

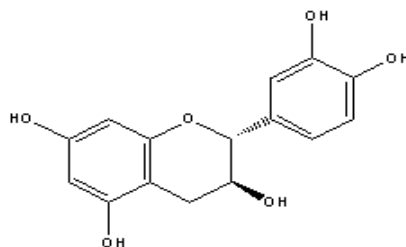


Figura 3. Estructura química de catequina

En un volumen final de 2 mL la mezcla de reacción contenía: diferentes concentraciones de los extractos de berries diluidos en agua. A estos volúmenes se les adicionó 100 µL de reactivo Folin Ciocalteau, 300 µL de carbonato de sodio 20% p/V y agua destilada suficiente para completar 2 mL. El blanco contenía todos los reactivos con excepción de los extractos de berries. Todas las mezclas así obtenidas fueron incubadas a oscuridad durante 2 horas. Al finalizar este

periodo, 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 del método se analizó realizando una curva de calibración utilizando catequina como estándar.

Condiciones oxidativas

Se utilizó el sistema generador de anión superóxido ($O_2^{\cdot-}$), $FeCl_3$ 600 μ M y ascorbato 1 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 [38]. 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 ($\epsilon_{532} = 156.000 M^{-1} cm^{-1}$).

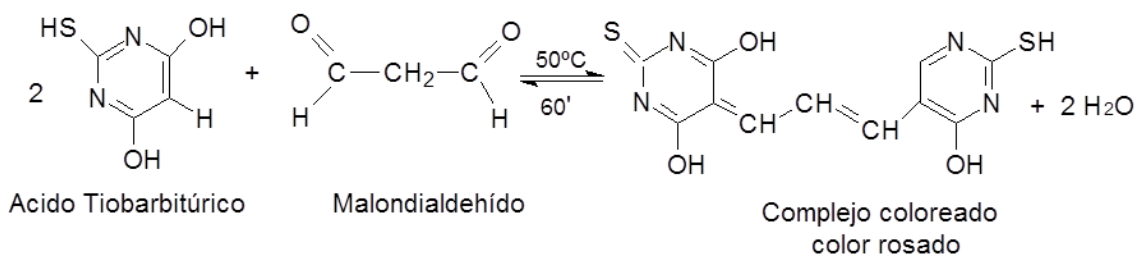


Figura 4. Formación del conjugado utilizado para medir TBARS.

Las mezclas de reacción contenían en concentraciones finales: microsomas (0,5 mg de proteína) suspendidos en amortiguador fosfato 50 mM, pH 7,4 los que fueron preincubados con los extractos durante 10 min a 37°C antes de agregar

el sistema oxidante Fe^{3+} /ascorbato. Los blancos contenían todos los reactivos con la única excepción de la proteína microsómica. Muestras y blancos fueron incubados durante 30 min a 37°C ; al cabo de este período, se les adicionó 0,5 mL de TCA 20% p/V frío (4°C) y luego, fueron centrifugados a 9000 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 fueron mezcladas con 0,5 mL de TBA 35 mM, y luego incubadas durante 60 min a 50°C para el desarrollo de color. Al término de este periodo, se registró la absorbancia de las muestras a 532 nm en un espectrofotómetro UV3 Unicam UV-VIS, usando los blancos como referencia.

Determinación de oxidación de tioles microsomales

La medición de los tioles totales se realizó de acuerdo a la técnica descrita por Letelier y cols., 2008 [38]. 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 $13.600 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$. La mezcla de reacción contenía en un volumen de 1,0 mL, los reactivos siguientes (concentraciones finales): amortiguador fosfato de potasio 50 mM, pH 7,4; proteína microsómica 0,5 mg; concentraciones de los distintos extractos naturales; FeCl_3 600 μM ; ascorbato 1 mM; DTNB 0,3mM. Los blancos contenían todos los reactivos, a excepción de la proteína microsómica. Para la prevención de la oxidación de los tioles microsómicos las mezclas se incubaron durante 15 min a temperatura ambiente sin adicionar el sistema pro oxidante, luego se incorporó el sistema Fe^{3+} /ascorbato y se incubó por 20 min, a 37°C , en un baño termorregulado y con agitación constante. A continuación se adicionó el DTNB a todas las mezclas y se incubaron nuevamente durante 60 min a 37°C en un baño termorregulado con agitación constante. Al cabo de este período las muestras se centrifugaron a 9000 g durante 10 min en una centrífuga refrigerada

(4 °C) Heraeus Biofuge 15R, con el objeto de decantar la suspensión microsómica. (En el caso de la reversión de la oxidación de los tioles microsómicos, se sometió a los microsomas al sistema pro oxidante por 5 minutos y luego se prosiguió como se describió anteriormente). A continuación, se leyeron las absorbancias de los sobrenadantes a 412 nm en un espectrofotómetro Unicam UV VIS modelo UV3 acoplado a un computador, utilizando para ello sus blancos respectivos.

Quelación de Cu²⁺

Una solución de CuSO₄ 0,5 mM en ausencia y presencia de los extractos de berries en estudio fue sometida a un barrido entre 200 y 600 nm, en un espectrofotómetro UV-VIS modelo UV3 acoplado a un computador. El espectro del CuSO₄ 0,5 mM se realizó utilizando como referencia, amortiguador fosfato 50 mM, pH 7,4. La referencia en el caso de las mezclas CuSO₄/extracto fue una alícuota del extracto en ensayo diluida en amortiguador fosfato 50 mM, pH 7,4.

Análisis estadístico

Los datos presentados corresponden al promedio de al menos 4 experimentos independientes ± 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 berries. La Tabla 1 muestra el contenido de polifenoles de los diferentes extractos en estudio. Dado que se utilizó como estándar de polifenoles, catequina, los resultados están expresados en mg equivalentes de catequina/g de extracto y en μ moles equivalentes de catequina/g de extracto. El contenido total de polifenoles menor le correspondió al preparado de Arándano $19,53 \pm 0,72$ μ moles equivalentes de catequina/g de extracto; le siguen el preparado de Murtilla con $28,25 \pm 0,52$ μ moles equivalentes de catequina/g de extracto y luego, el extracto de Maqui que contiene la mayor cantidad de polifenoles $200,17 \pm 2,41$ μ moles equivalentes de catequina/g de extracto.

Tabla 1. Polifenoles totales

<i>Extractos</i>	<i>mg equivalentes de catequina/g de extracto</i>	<i>μmoles equivalentes de catequina/g de extracto</i>
<i>Arándano</i>	$5,67 \pm 0,21$	$19,53 \pm 0,72$
<i>Maqui</i>	$58,10 \pm 0,7$	$200,17 \pm 2,41$
<i>Murtilla</i>	$8,20 \pm 0,15$	$28,25 \pm 0,52$

Catequina fue utilizada como estándar. Los valores representan el promedio de al menos 7 experimentos independientes \pm DE.

Prevención de la lipoperoxidación microsómica inducida por el sistema Fe^{3+} /ascorbato en presencia de los extractos de berries. En la Figura 5 aparecen las curvas directas de las concentraciones de los preparados de berries versus el % de lipoperoxidación residual medida en presencia de los preparados. A partir de estos datos, 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 preparado herbal capaz de prevenir en un 50% la lipoperoxidación microsómica inducida por el sistema Fe^{3+} /ascorbato. El extracto de Maqui mostró el menor EC_{50} : 1,01 η moles equivalentes de catequina/0,5 mg proteína microsómica, por lo tanto, es el preparado que mostró mayor actividad antilipoperoxidante. Le sigue el Arándano con un EC_{50} de 5,12 η moles equivalentes de catequina/0,5 mg proteína microsómica, y por último el EC_{50} mayor, que correspondió al extracto de Murtilla: 6,83. η moles equivalentes de catequina/0,5 mg proteína microsómica. Es importante destacar que, a pesar de que los EC_{50} de arándano, murtilla y maqui fueron similares, el extracto de maqui mostró una mayor cantidad de polifenoles por gramo de preparado.

Uno de los mecanismos a través de los cuales los antioxidantes polifenólicos ejercen su efecto antioxidante es a través de su capacidad de secuestrar radicales libres. En este trabajo se utilizó como sistema pro-oxidante Fe^{3+} /ascorbato el cual genera el radical anión superóxido a través de la reacción de Haber Weiss-Fenton. Así, postulamos una posible correlación entre la capacidad anti-lipoperoxidante medida como EC_{50} y la concentración de polifenoles de los extractos. La Figura 6 muestra una comparación entre el contenido de polifenoles y los EC_{50} de la lipoperoxidación. Los valores del gráfico como el coeficiente de regresión de la recta (0,8920) que se observa en el gráfico inserto muestra que no existe proporcionalidad entre el contenido de polifenoles y la capacidad antilipoperoxidante de los extractos.

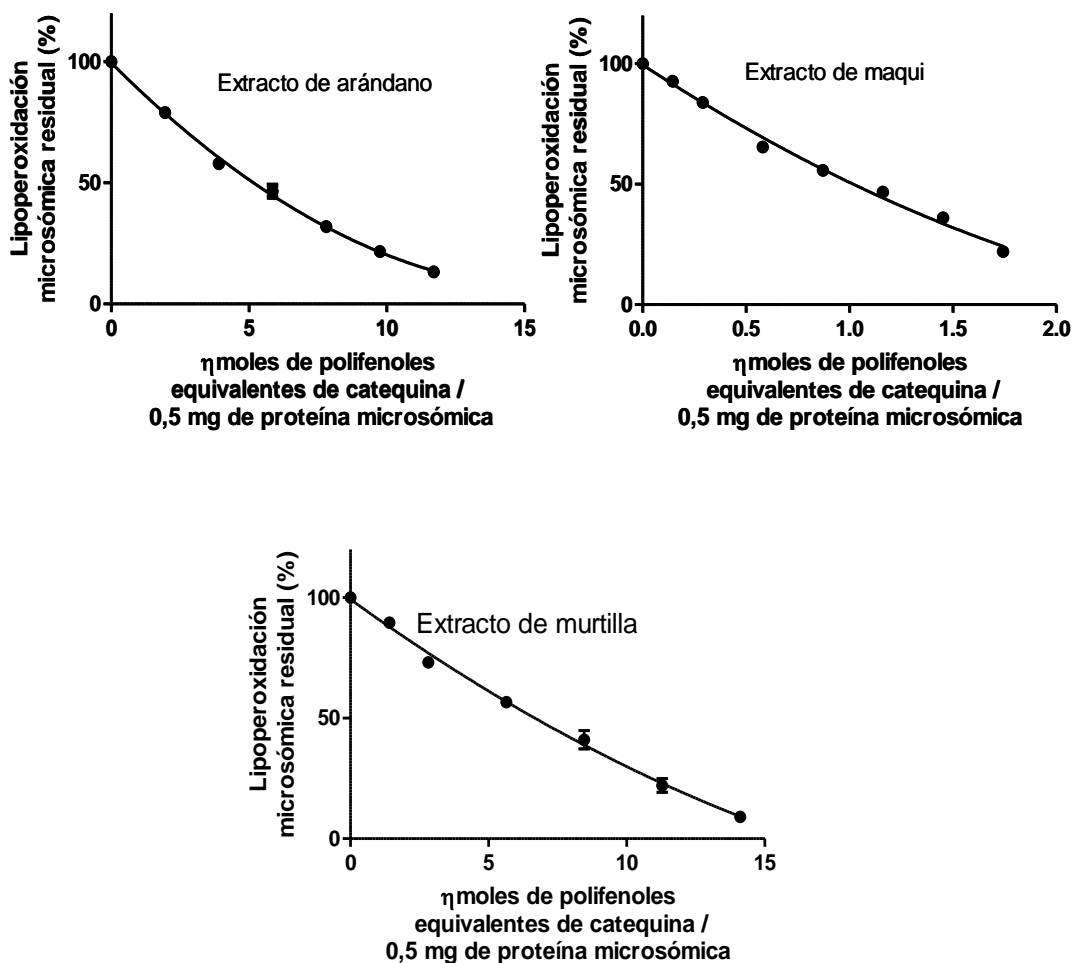


Figura 5. Lipoperoxidación microsómica inducida por el sistema Fe^{3+} /ascorbato en presencia de los extractos de berries. El porcentaje de lipoperoxidación residual; ésta fue calculada considerando como 100% aquella obtenida en ausencia de extracto. El ensayo de lipoperoxidación se realizó de acuerdo a lo descrito en Métodos. Los valores representan el promedio de al menos 3 experimentos independientes \pm DE. r^2 de las curvas: arándano = 0,9949; maqui = 0,9928; murtilla = 0,9926.

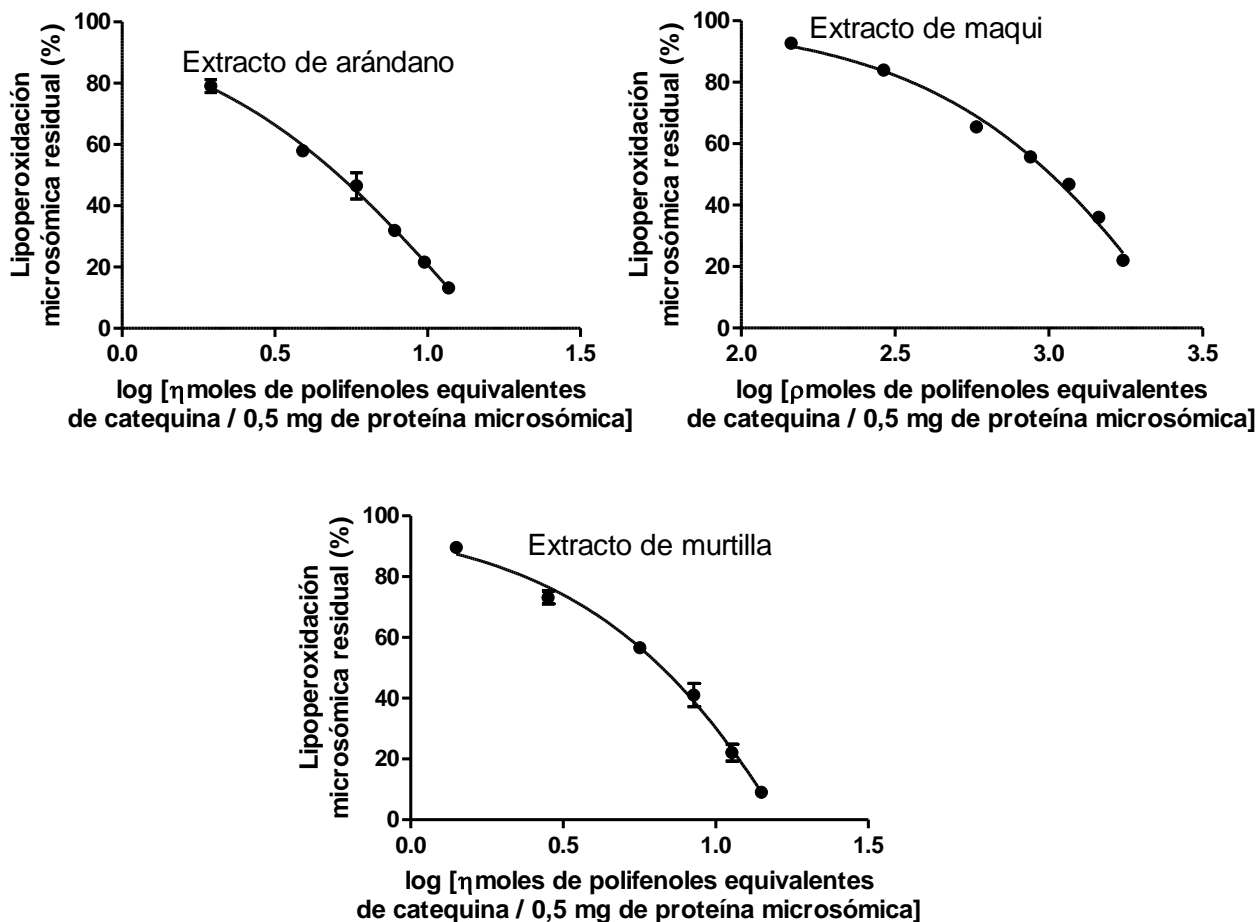


Figura 6. Gráficos semilogarítmicos de la lipoperoxidación microsómica inducida por el sistema Fe^{3+} /ascorbato en presencia de los extractos de berries. Los gráficos fueron construidos a partir de los datos de la Figura 5. El ensayo de lipoperoxidación se realizó de acuerdo a lo descrito en Métodos. Los valores representan el promedio de al menos 3 experimentos independientes \pm DE. r^2 de las curvas: arándano = 0,9909; maqui = 0,9909; murtilla = 0,9894.

Tabla 2. Efecto comparativo de los preparados de berries sobre la lipoperoxidación microsómica inducida por el sistema Fe³⁺/ascorbato

<i>Extractos</i>	<i>EC₅₀ (ηmoles de catequina/0,5 mg de proteína microsómica)</i>	<i>EC₅₀ (μg de extracto seco)/0,5 mg de proteína microsómica</i>
<i>Arándano</i>	5,12	262
<i>Maqui</i>	1,01	5
<i>Murtilla</i>	6,83	241

EC₅₀: cantidad de extracto 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.

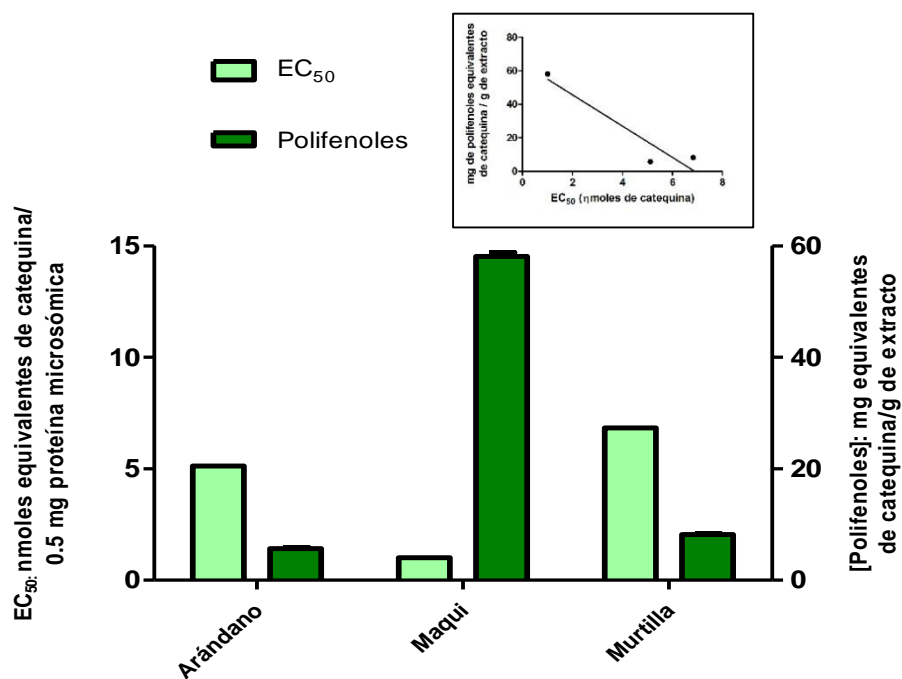


Figura 7. EC₅₀ de la lipoperoxidación microsómica versus la concentración de polifenoles de los extractos. Los valores de EC₅₀ fueron obtenidos de las curvas semilogarítmicas y aparecen en la Tabla 6 y los de [Polifenoles] aparecen en la Tabla 5. El gráfico inserto representa el intento de correlación lineal entre concentración de polifenoles y EC₅₀ del extractos. El coeficiente de regresión lineal de la recta que se muestra en el gráfico inserto fue 0,8920.

Prevención de la oxidación de tioles microsómicos inducida por el sistema Fe^{3+} /ascorbato. La Figura 8 muestra las curvas de las concentraciones de los extractos expresadas en η moles de polifenoles equivalentes de catequina / 0,5 mg de proteína microsómica *versus* el % de oxidación de tioles microsómicos recuperados. A partir de estos datos, se construyeron las curvas semilogarítmicas que se muestran en la Figura 9. De estas curvas se obtuvieron los EC_{50} que aparecen en la Tabla 3. El extracto de maqui mostró el menor EC_{50} (10,3 η moles equivalentes de catequina / 0,5 mg proteína microsómica), por lo tanto, es el que presentó mayor capacidad para prevenir la oxidación de los tioles microsómicos. Los EC_{50} de arándano y murtilla fueron mayores, 19,5 η moles y 27,9 η moles equivalentes de catequina/0,5mg de proteína microsómica, respectivamente.

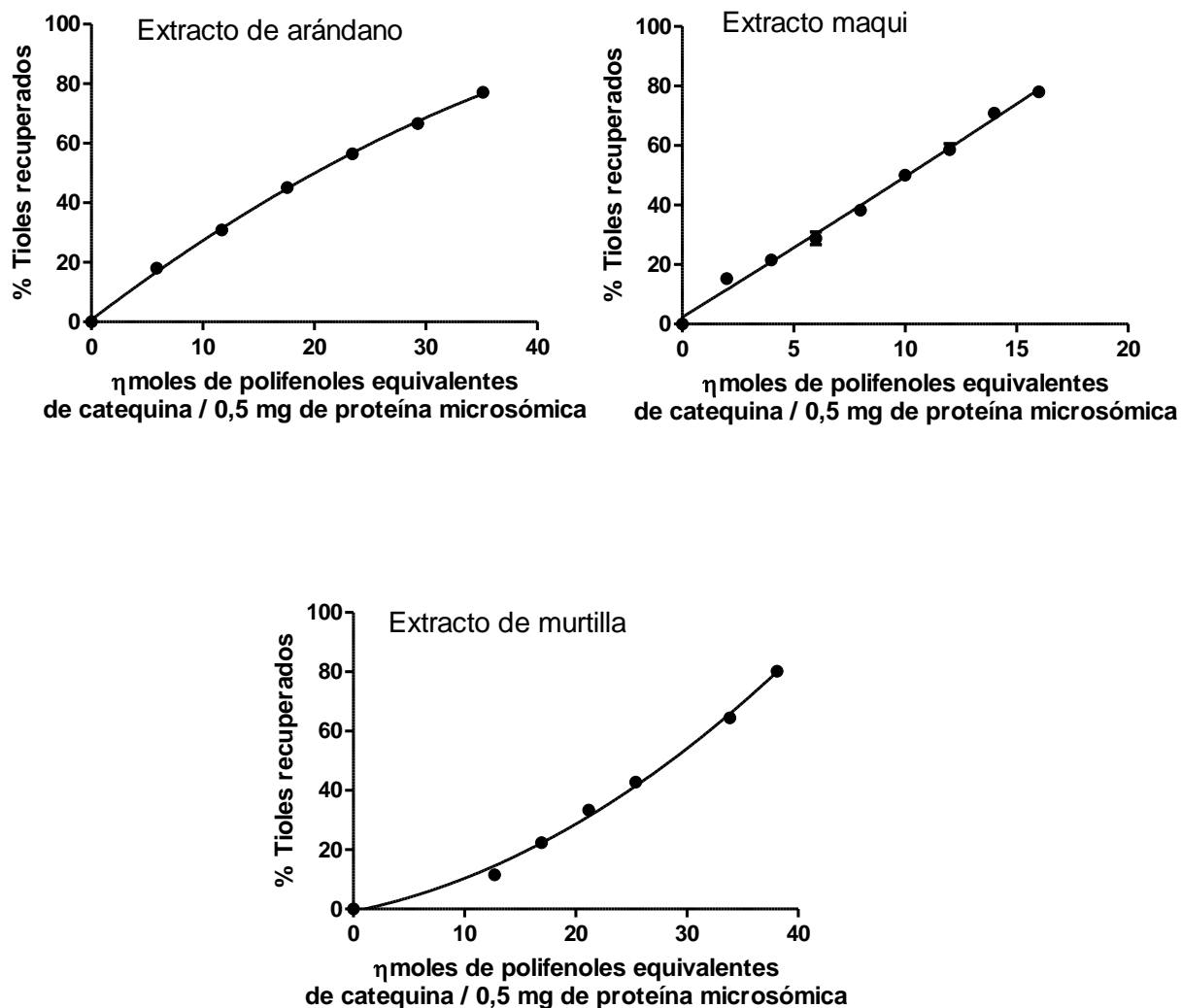


Figura 8. Prevención de la oxidación de tioles microsómicos inducida por el sistema Fe^{3+} /ascorbato en presencia de los extractos de berries. El porcentaje de tioles microsómicos recuperados fue calculado considerando como 0% aquel obtenido por la diferencia entre el total de tioles microsómicos y los tioles no dañados después de agregar el sistema Fe^{3+} /ascorbato en ausencia del 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 3 experimentos independientes \pm DE. r^2 de las curvas: arándano = 0,9982; maqui = 0,9924; murtilla = 0,9954.

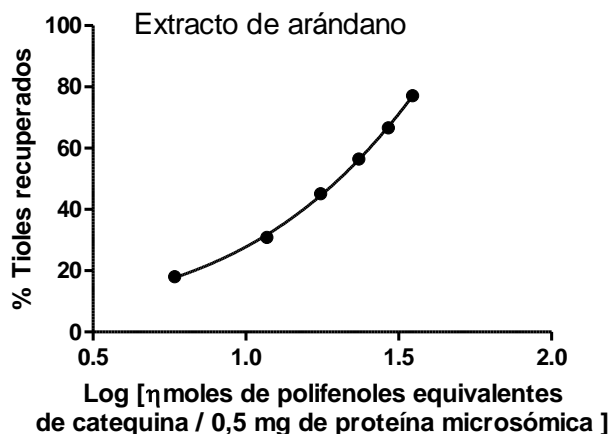
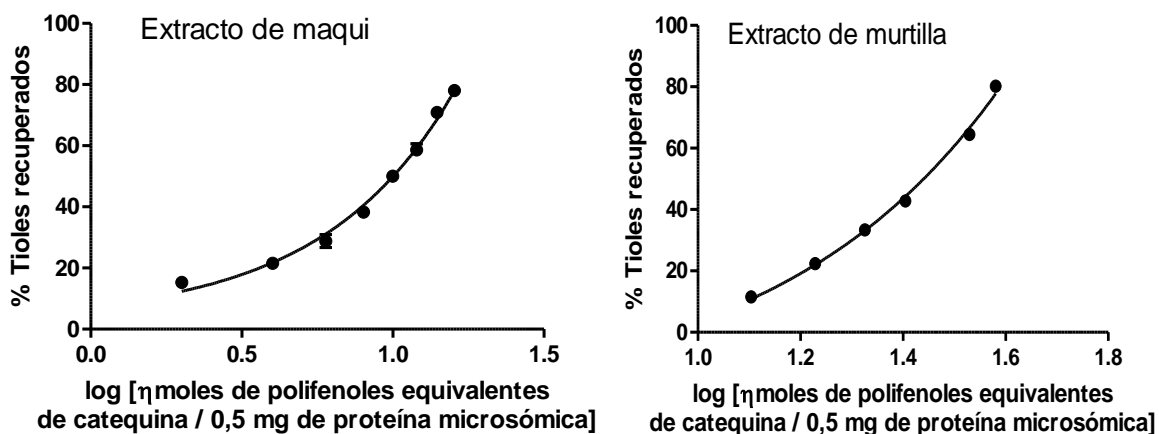


Figura 9. Gráficos semilogarítmicos de la prevención de la oxidación de los tioles microsómicos inducido por el sistema Fe^{3+} /ascorbato en presencia de los extractos de berries. Los gráficos semilogarítmicos fueron construidos a partir de los datos de la Figura 8. El ensayo de prevención de la oxidación de los tioles microsómicos se realizó de acuerdo a lo descrito en Métodos. Los valores representan el promedio de al menos 3 experimentos independientes \pm DE. r^2 de las curvas: arándano = 0,9976; maqui = 0,9900; murtila = 0,9917.

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

<i>Extractos</i>	<i>EC₅₀ (ηmoles)</i>	<i>EC₅₀ (μg de extracto seco)</i>
<i>Arándano</i>	19,8	1014
<i>Maqui</i>	10,3	51
<i>Murtilla</i>	27,9	987

EC₅₀: concentración expresada en ηmoles equivalentes de catequina /0,5 mg de proteína microsómica y mg de preparado que previene en un 50% la oxidación de los tioles microsómicos inducida por Fe³⁺/ascorbato. Los valores fueron obtenidos de los gráficos semilogarítmicos que aparecen en la Figura 9. Los valores experimentales representan el promedio de al menos 3 experimentos independientes ± DE.

Reversión de la oxidación de tioles microsómicos inducida por el sistema Fe³⁺/ascorbato. En la Figura 10 aparecen las curvas de las concentraciones de los extractos versus el % de tioles microsómicos residuales. A partir de estos datos, se construyeron las curvas semilogarítmicas que se muestran en la Figura 11. De estas curvas se obtuvieron los EC₅₀ que aparecen en la Tabla 4. El valor de EC₅₀ menor le correspondió al extracto de Maqui: 38,3 η moles equivalentes de catequina/0,5 mg proteína microsómica. Por lo tanto, este preparado fue el que presentó la mayor capacidad para revertir la oxidación de los tioles microsómicos. Los preparados de Arándano y Murtilla presentaron EC₅₀ similares: 62,5 η moles y 58,3 η moles equivalentes de catequina/0,5 mg proteína microsómica, respectivamente.

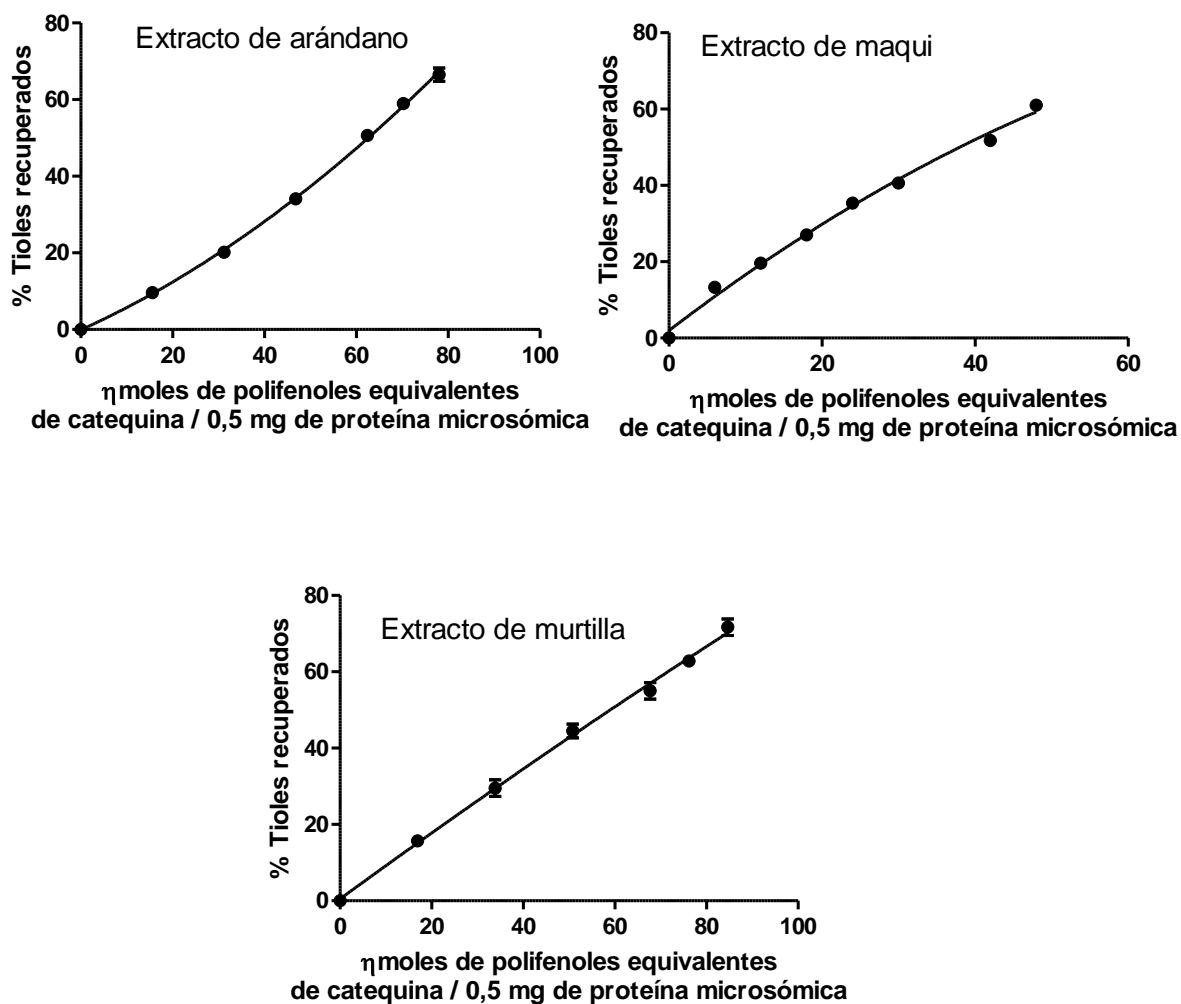


Figura10. Reversión de la oxidación de tioles microsómicos inducida por el sistema Fe^{3+} /ascorbato en presencia de los extractos de berries. El porcentaje de tioles microsómicos recuperados fue calculado considerando como 0% aquel obtenido por la diferencia entre el total de tioles microsómicos y los tioles no dañados después de agregar el sistema pro oxidante en ausencia del extracto. El ensayo de reversión de la oxidación de los tioles microsómicos se realizó de acuerdo a lo descrito en Métodos. Los valores representan el promedio de al menos 3 experimentos independientes \pm DE. r^2 de las curvas: arándano = 0,9979; maqui = 0,9919; murtilla = 0,9944.

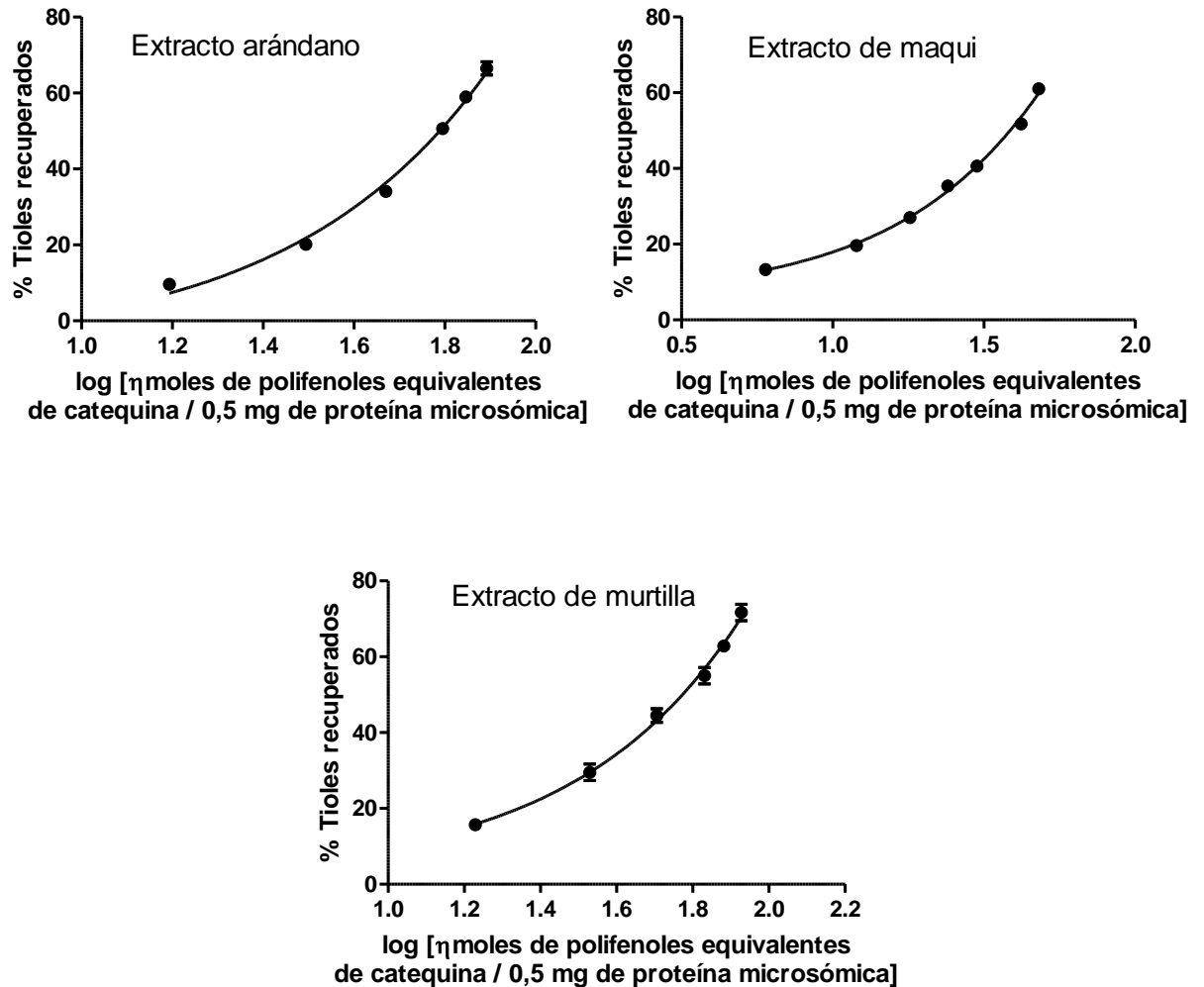


Figura 11. Gráficos semilogarítmicos de la reversión de la oxidación de los tioles microsómicos inducido por el sistema Fe^{3+} /ascorbato en presencia de los extractos de berries. Los gráficos semilogarítmicos fueron construidos a partir de los datos de la Figura 10. El ensayo de prevención de la oxidación de los tioles microsómicos se realizó de acuerdo a lo descrito en Métodos. Los valores representan el promedio de al menos 3 experimentos independientes \pm DE. r^2 de las curvas: arándano = 0,9917; maqui = 0,9934; murtilla = 0,9903.

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

<i>Extractos</i>	<i>EC₅₀ (ηmoles)</i>	<i>EC₅₀ (μg de extracto seco)</i>
<i>Arándano</i>	62,5	3199
<i>Maqui</i>	38,3	191
<i>Murtilla</i>	58,3	2063

EC₅₀: concentración de extracto expresada en ηmoles equivalentes de catequina /0,5 mg de proteína microsómica y μg de extracto/0,5 mg de proteína microsómica que revierte en un 50% la oxidación de los tioles microsómicos inducida por Fe³⁺/ascorbato. Los valores de EC₅₀ fueron obtenidos de los gráficos semilogarítmicos que aparecen en la Figura 11.

Capacidad quelante de Cu^{2+} de los diferentes extractos. La Figura 12 muestra los espectros de absorbancia de una solución de CuSO_4 0,5 mM en ausencia y presencia del extracto de Arándano, Maqui y Murtilla. El CuSO_4 presentó un pico de absorbancia a los 200nm con una absorbancia máxima de 1,235 Unidades de absorbancia (UA). El extracto de maqui fue el que presentó mayor efecto quelante, 120 μg de extracto provocaron una disminución del pico a 200 nm del ión Cu^{2+} desde 1,235 UA a 0,724 UA. El extracto de Murtilla fue capaz de disminuir a 0,590 UA el pico del ión, pero para ello fue necesario usar 10 veces más cantidad de extracto (1200 μg). Utilizando la misma cantidad de extracto de arándano que la usada con murtilla, solo se llegó a 0,893 UA. Este último extracto mostró la más baja capacidad quelante.

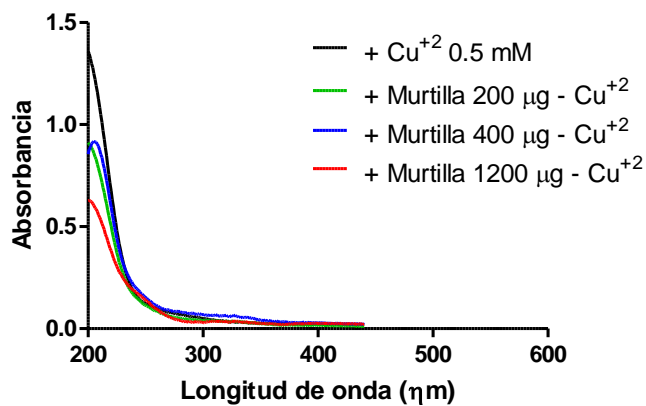
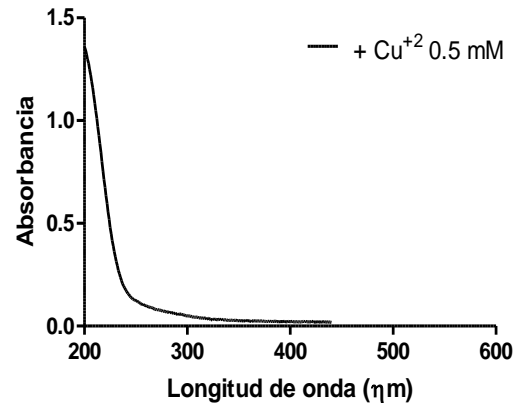
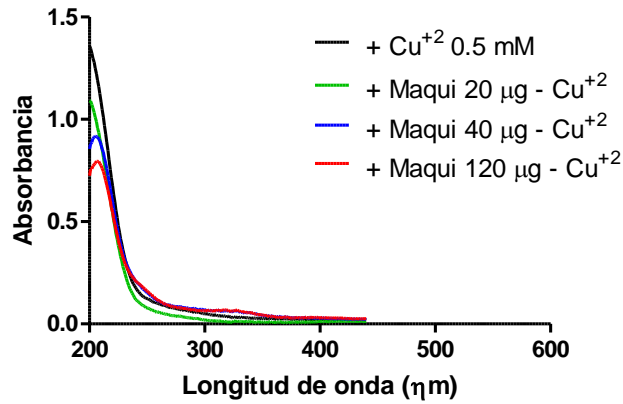
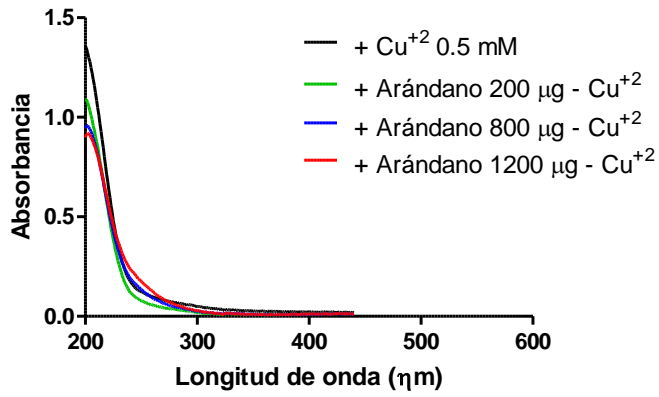


Figura 12. Modificación del espectro de absorbancia de Cu^{2+} en presencia de los extractos de berries. $[\text{CuSO}_4]$: 0,5 mM. La figura representa el espectro experimental obtenido con los extractos de Arándano, Maqui y Murtilla.

IV. DISCUSIÓN

En general, todas las patologías están asociadas al fenómeno de estrés oxidativo [39]. Es por ello que postulamos que los extractos herbales pueden ser una importante alternativa terapéutica cuando nos enfrentamos a enfermedades especialmente ligadas a estrés oxidativo, como son el cáncer y también las relacionadas con el envejecimiento [40]. La actividad antioxidante de los fitofármacos está dada por el contenido y tipo de antioxidantes presentes en ellos. Los compuestos antioxidantes mayoritarios en los preparados herbales comerciales son los polifenoles. En el caso de los preparados de berries, el tipo de compuestos antioxidantes más abundantes son los compuestos antocianos. Estudios realizados con compuestos polifenólicos purificados son bastante abundantes en la literatura; sin embargo, estos estudios son escasos en preparados herbales polivalentes, es decir, que tienen compuestos de diversa naturaleza que podrían generar efecto antioxidante. Esta polivalencia de compuestos en preparados herbales genera una actividad sinérgica y por tanto, un efecto mayor que aquel de un compuesto aislado.

En la célula animal el GSH es el compuesto antioxidante no enzimático más abundante. Compuestos antioxidantes azufrados como GSH también están presentes en plantas. 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 las proteínas [41]. 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 [41].

Es importante decir, que existen diferentes preparados comerciales de extractos de berries. Esto, en la mayoría de los casos resulta en que la concentración y

actividad de los antioxidantes presentes en ellos no es necesariamente la misma. Es por ello, que en este trabajo nos interesó evaluar la actividad antioxidante de diferentes extractos de frutos de berries: arándano, murtila y maqui. Los resultados de la lipoperoxidación de los microsomas hepáticos de rata mostraron que el extracto de maqui, que fue el de mayor contenido de polifenoles, fue también el que tuvo el menor EC_{50} , por lo tanto, la mayor actividad anti lipoperoxidante (Figuras 4 y 5; Tabla 2). Al comparar los EC_{50} de los extractos expresados en nmoles equivalentes de catequina / 0,5 mg de proteína microsómica, los valores de los extractos de arándano y murtila fueron muy similares, aproximadamente 5 a 6 veces mayores al del maqui. Sin embargo, cuando los valores se expresaron en μ g de extracto, dicha diferencia aumentó a 50 veces. Esta diferencia en los EC_{50} de los berries podría deberse a las propiedades físico-químicas de los principios antioxidantes. Así por ejemplo, el extracto de maqui parece contener mayor cantidad de antioxidantes lipofílicos que aquellos del arándano y la murtila. Estos antioxidantes lipofílicos tendrían mayor afinidad por los lípidos de la membrana microsómica y por tanto, mayor afinidad por ella. Este postulado parece estar respaldado por la falta de correlación entre los valores de EC_{50} y el contenido de polifenoles de los extractos (Figura 6).

Al igual que en la lipoperoxidación, el extracto de maqui fue el que mostró la mejor capacidad para prevenir y revertir la oxidación de los tioles microsómicos. Sin embargo, si se compara la cantidad de extracto para alcanzar los EC_{50} de la lipoperoxidación microsómica con los de la prevención y la reversión de la oxidación de los tioles microsómicos, para alcanzar estos últimos fue necesario aumentar 10 y 40 veces, respectivamente la cantidad de extracto herbal. Similares resultados a los de maqui, se observaron con el extracto de arándano y el de murtila. La capacidad de prevenir la oxidación de los tioles del extracto de arándano fue mejor que la del extracto de murtila. La mayor cantidad de

extracto de berries utilizada en estos ensayos, probablemente se deba a que las proteínas microsómicas, en general, están insertas en la membrana; en cambio los lípidos están localizados hacia el exterior de ella. Cabe señalar además, que la oxidación de los lípidos no es reversible, dado a que se rompen enlaces carbono-carbono. Sin embargo la oxidación de los tioles forma como producto principal enlaces disulfuros (-S-S-) los cuales pueden ser reducidos entre otros reductores, por compuestos tiólicos presentes en los extractos herbales.

Otro de los mecanismos antioxidantes importantes para la célula es la capacidad de algunos compuestos de quelar metales redox activos como son los iones libres de hierro y cobre. Los iones libres de estos metales, en su estado reducido generan EROs y de esta forma pueden sobrepasar la capacidad antioxidante. Es por eso que en este trabajo se probó una técnica cualitativa para probar la capacidad de los diferentes extractos de berries de quelar iones Cu^{+2} . El espectro de absorbancia del ion Cu^{+2} medido entre 200 y 450 nm fue modificado por los 3 extractos, fenómeno que se manifestó en la disminución del pico de absorbancia a 200 nm. El extracto de murtilla provocó la disminución mayor, seguida por el extracto de maqui. El extracto de arándano mostró casi una nula disminución del pico en las distintas concentraciones probadas, lo que sugiere que la capacidad quelante de dicho preparado es muy baja. Estos resultados muestran nuevamente diferencias en el tipo de compuestos que podrían actuar como antioxidantes celulares mediante el mecanismo de quelación de iones metálicos.

Resumiendo podemos destacar que el alto contenido de polifenoles presentes en el extracto de maqui como también su excelente capacidad antioxidante de biomoléculas en comparación con los extractos de arándano y murtilla, permite proponerlo como un excelente preparado para la formulación de un fitofármaco antioxidante. Más aún, la alta actividad antioxidante obtenida con pequeñas cantidades de extracto nos permite predecir que formulaciones farmacéuticas de

este preparado serían seguras, es decir, el riesgo de aparición de efectos adversos como también las interacciones medicamentosas, escasos.

Los resultados mostrados en este trabajo confirman la hipótesis planteada, ya que los distintos extractos, mostraron capacidades muy diferentes para prevenir la lipoperoxidación microsómica, para prevenir y revertir la oxidación de los tioles microsómicos y para quelar metales como el ion Cu^{2+} .

V. CONCLUSIÓN

Los extractos de arándano, maqui y murtila resultaron con actividad antioxidante sobre el sistema biológico, obteniendo valores de EC_{50} , por ejemplo, para prevención de lipoperoxidación de 5,12 η moles, 1,01 η moles y 6,83 η moles, respectivamente. El extracto de maqui fue el que mostró la mejor actividad antioxidante. Este extracto presentó EC_{50} hasta 5 veces menores, en los ensayos realizados comparado con los extractos de arándano y murtila. Mostrando la mejor capacidad para prevenir la lipoperoxidación de microsomas hepáticos de rata, y prevenir y revertir la oxidación de los tioles microsómicos. Además, fue el extracto con mayor contenido de polifenoles equivalentes de catequina, conteniendo 10 veces más antioxidantes por gramo de extracto seco comparando con los dos restantes. El extracto de maqui fue por lo tanto el más eficiente.

VI. REFERENCIAS

- [1] Benzie IF (2000) Evolution of antioxidant defence mechanisms. *Eur J Nutr* 39: 53-61.
- [2] Deneke SM (2000) Thiol-based antioxidants. *Curr Top Cell Regul* 36: 151-180.
- [3] De Gara L, Locato V, Dipierro S, de Pinto MC (2010) Redox homeostasis in plants. The challenge of living with endogenous oxygen production. *RespirPhysiolNeurobiol* 173 Suppl: S13-19.
- [4] Kornas A, Kuzniak E, Slesak I, Miszalski Z (2010) The key role of the redox status in regulation of metabolism in photosynthesizing organisms. *ActaBiochim Pol* 57: 143-151.
- [5] Shao HB, Chu LY, Shao MA, Jaleel CA, Mi HM (2008) Higher plant antioxidants and redox signaling under environmental stresses. *C R Biol* 331: 433-441.
- [6] Bors W, Michel C (2002) Chemistry of the antioxidant effect of polyphenols. *Ann N Y AcadSci* 957: 57-69.
- [7] Fraga CG, Galleano M, Verstraeten SV, Oteiza PI (2010) Basic biochemical mechanisms behind the health benefits of polyphenols. *Mol Aspects Med* 31: 435-445.
- [8] Sies H (2010) Polyphenols and health: update and perspectives. *Arch BiochemBiophys* 501: 2-5.
- [9] Schafer FQ, Buettner GR (2001) Redox environment of the cell as viewed through the redox state of the glutathione disulfide/glutathione couple. *Free RadicBiol Med* 30: 1191-1212.
- [10] Wu G, Fang YZ, Yang S, Lupton JR, Turner ND (2004) Glutathione metabolism and its implications for health. *J Nutr* 134: 489-492.
- [11] Wouters MA, Fan SW, Haworth NL (2010) Disulfides as redox switches: from molecular mechanisms to functional significance. *Antioxid Redox Signal* 12: 53-91.

- [12] Newcomb M, Chandrasena RE (2005) Highly reactive electrophilic oxidants in cytochrome P450 catalysis. *BiochemBiophys Res Commun* 338: 394-403.
- [13] Klaassen CD, Reisman SA (2010) Nrf2 to the rescue: effects of the antioxidative/electrophilic response on the liver. *ToxicolApplPharmacol* 244: 57-65.
- [14] Masella R, Mazza G (2009) Glutathione and sulfur amino acids in human health and disease. Wiley, Hoboken.
- [15] Banerjee R (2008) Redox biochemistry. Wiley-Interscience, Hoboken, N.J.
- [16] Jones DP (2008) Radical-free biology of oxidative stress. *Am J Physiol Cell Physiol* 295: C849-868.
- [17] Lian-Sai Chia (2003) Analysis and biological activities of anthocyanins. *Phytochemistry* 64: 923-933.
- [18] Nohynek L. J (2006) Berry phenolics: antimicrobial properties and mechanisms of action against severe human pathogens. *Nutrition and cancer* 54: 18–32.
- [19] Kuskoski E. M (2004) Actividad antioxidante de pigmentos antociánicos. *Ciência e Tecnologia de Alimentos* 24: 691–693.
- [20] Ruiz A.; Herмосín-Gutiérrez I. (2010) Polyphenols and antioxidant activity of calafate (*Berberis microphylla*) fruits and other native berries from Southern Chile. *Journal of agricultural and food chemistry* 58: 6081–6089.
- [21] Bouzid W.; Zoughlache S. D. (2009) Antibacterial Activity of Some Fruits ; Berries and Medicinal Herb Extracts Against Poultry Strains of Salmonella. *6: 12–15.*
- [22] Toivanen M.; Huttunen S. (2011) Inhibition of adhesion of *Neisseria meningitidis* to human epithelial cells by berry juice polyphenolic fractions. *Phytotherapy research* 25: 828–832.
- [23] Huttunen S.; Toivanen M. (2011) Inhibition activity of wild berry juice fractions against *Streptococcus pneumoniae* binding to human bronchial cells. *Phytotherapy research* 25: 122–127.

- [24] Mølgaard P.; Holler J. G (2011) Antimicrobial evaluation of Huilliche plant medicine used to treat wounds. *Journal of ethnopharmacology* 138: 219–227.
- [25] Escribano-Bailón M. T.; Alcalde-Eon C.; Muñoz O.; Rivas-Gonzalo J. C.; Santos-Buelga C. (2006) Anthocyanins in berries of Maqui [*Aristotelia chilensis* (Mol.) Stuntz]. *Phytochemical Analysis* 17: 8–14.
- [26] Avello M.; Valdivia R. (2006) Actividad de *Ugni molinae* Turcz frente a microorganismos de importancia clínica *BLACPMA* 2: 141-144.
- [27] Burdulis D.; Sarkinas A. (2009) Comparative study of anthocyanin composition, antimicrobial and antioxidant activity in bilberry (*Vaccinium myrtillus* L.) and blueberry (*Vaccinium corymbosum* L.) fruits. *Acta Poloniae Pharmaceutica - Drug Research* 66: 399–408.
- [28] Shene C.; Reyes A. K. (2008) Plant location and extraction procedure strongly alter the antimicrobial activity of murta extracts. *European Food Research and Technology* 228: 467–475.
- [29] Schreckinger M. E.; Wang J. (2010) Antioxidant Capacity and in Vitro Inhibition of Adipogenesis and Inflammation by Phenolic Extracts of *Vaccinium floribundum* and *Aristotelia chilensis*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 58: 8966–8976.
- [30] Céspedes C. (2008) Antioxidant and cardioprotective activities of phenolic extracts from fruits of Chilean blackberry *Aristotelia chilensis* (Elaeocarpaceae), Maqui. *Food Chemistry* 107: 820-829
- [31] Torres A.; Seguel I. (1999) Caracterización fisicoquímica de frutos de murtilla (*Ugni molinae* Turcz). *Agricultura técnica (Chile)* 59: 260-270.
- [33] Giongo L. (2013) Texture profiling of blueberries (*Vaccinium* spp.) during fruit development, ripening and storage. *Postharvest Biology and Technology* 76: 34–39
- [34] Cunningham D. (2005) Constituyentes fisicoquímicos del arándano americano. *Revista de fitoterapia* 5: 5-16.
- [35] Letelier M. E. (2010) Comparative effects of superoxide anion and hydrogen peroxide on microsomal and cytosolic glutathione S-transferase activities of rat liver. *Biological trace element research* 134: 203–211.

- [36] Lowry O. H (1951) Protein measurement with the Folin phenol reagent. *The Journal of biological chemistry* 193: 265–275.
- [37] Letelier M. E (2009) Evaluation of the antioxidant properties and effects on the biotransformation of commercial herbal preparations using rat liver endoplasmic reticulum. 8: 110–120.
- [38] Letelier M. E. (2008) Possible mechanisms underlying copper-induced damage in biological membranes leading to cellular toxicity. *Chemico-biological interactions* 151: 71–82.
- [39] Emerit J. (2010) Neurodegenerative diseases and oxidative stress. *Biomedicine & Pharmacotherapy*. 58: 39-46.
- [40] Gordon M. (2005) Plants as a source of anti-cancer agents. *Journal of Ethnopharmacology*. 100: 72-79.
- [41] Thomas J.A (1997) Protein sulfhydryls and their role in the antioxidant function of protein S-thiolation. 319: 1-19.