

**UNIVERSIDAD DE CHILE**  
**FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS Y FARMACÉUTICAS**  
**DEPARTAMENTO DE QUÍMICA FARMACOLÓGICA Y TOXICOLÓGICA**  
**LABORATORIO DE FARMACOLOGÍA**



**EXTRACTO HIDROALCOHÓLICO DE *Bluddleja globosa* Y EXTRACTO SECO DE**  
***Rosmarinus officinalis* COMO PRESERVANTES DE FILETES DE**  
***Oncorhynchus mykiss***

**PROFESOR PATROCINANTE**

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

**DIRECTOR DE MEMORIA**

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

Memoria para optar al título de Bioquímico

**JUAN GUILLERMO GORMAZ ARAYA**

**SANTIAGO DE CHILE**

**2005**

***LO MAS IMPORTANTE EN LA  
VIDA ES LA PERSEVERANCIA, NO ES  
EVITAR LAS CAIDAS SINÓ APRENDER  
LEVANTASE DE ELLAS.***

*A mi profesora MEL, por su incondicional apoyo.*

## **AGRADECIMIENTOS**

*Quiero agradecer a mi papá, mamá, hermana y a mis abuelos, por apoyarme durante mi carrera. Gracias por todo el cariño y la paciencia. Los quiero mucho.*

*Este trabajo no hubiese terminado de una manera tan exitosa sin el apoyo de la Doctora María Eugenia Letelier. Nunca terminaré de agradecerle todas las horas que dedico a mi formación, tanto científica como personal. Gracias por ser mi profesora, amiga y referente de vida.*

*Durante la carrera conocí a muchos compañeros, pero sólo a tres grandes amigos y una amiga. Carlos, Juan Ignacio, Víctor y Claudia: gracias por la amistad y por tantos momentos inolvidables.*

*Agradezco también a la Sra. Ximena Polanco, sin su apoyo no se hubiese podido llevar a cabo este trabajo. Gracias a Ud y a su equipo por su constante interés y colaboración.*

*Por último quiero agradecer a la Sra. Guisela, Don Miladio y Don José, quienes colaboraron desinteresadamente en este trabajo.*

## ABREVIATURAS

|                  |  |
|------------------|--|
| BHT              | : 2,6-diterbutil-4-hidroxi-tolueno   |
| DMSO             | : Dimetil-sulfóxido  |
| DTNB             | : Ácido 5-tio-2-nitrobenzoico  |
| MDA              | : Malondialdehído  |
| TBA              | : Ácido 2-tiobarbitúrico   |
| TBARS            | : Sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico   |
| TCA              | : Ácido tricloroacético  |
| IC <sub>50</sub> | : Concentración de antioxidante que inhibe el 50% de la lipoperoxidación de homogeneizado de filete de trucha, inducida por el sistema oxidativo Fe <sup>3+</sup> /ascorbato |

## ÍNDICE GENERAL

|  | <b>Página</b> |
|--|---------------|
| DEDICATORIA.....   | ii            |
| AGRADECIMIENTOS.....   | iii           |
| ABREVIATURAS.....  | iv            |
| ÍNDICE GENERAL.....  | v             |
| ÍNDICE DE FIGURAS.....                                       | vi            |
| INDICE DE TABLAS.....  | vii           |
| RESUMEN.....   | viii          |
| SUMMARY.....   | ix            |
| I. INTRODUCCIÓN.....   | 1             |
| Hipótesis.....   | 10            |
| Objetivo general.....  | 11            |
| Objetivos específicos.....                                   | 11            |
| II. MATERIALES Y MÉTODOS.....                                | 13            |
| Reactivos.....   | 13            |
| Animales de experimentación.....                             | 14            |
| Homogeneizado de filetes de <i>Oncorhynchus mykiss</i> ..... | 14            |
| Lipoperoxidación.....  | 14            |
| Determinación de tioles totales.....                         | 15            |
| Cuantificación de polifenoles totales.....                   | 16            |
| Análisis estadístico.....                                    | 16            |
| III. RESULTADOS.....   | 17            |
| IV. DISCUSIÓN.....   | 27            |
| Conclusiones.....  | 32            |
| V. REFERENCIAS.....  | 33            |
| Anexo I.....   | 38            |

## ÍNDICE DE FIGURAS

|          |  |         |
|----------|--|---------|
| Figura 1 | Lipoperoxidación espontánea de filetes de trucha arcoiris. Curva de Proteína.  | Pág. 18 |
| Figura 2 | Efecto del tiempo de incubación sobre la lipoperoxidación espontánea de filetes de trucha arcoiris.  | Pág. 18 |
| Figura 3 | Efecto de la temperatura de incubación sobre la lipoperoxidación espontánea de filetes de trucha arcoiris.   | Pág. 19 |
| Figura 4 | Inhibición de la lipoperoxidación espontánea de filetes de trucha arcoiris. Efecto del matico.   | Pág. 20 |
| Figura 5 | Lipoperoxidación inducida por el sistema oxidativo Fe <sup>3+</sup> /ascorbato en filetes de trucha arcoiris. Efecto de la concentración de homogeneizado, medido como mg de proteína/ mL. | Pág. 21 |
| Figura 6 | Efecto del tiempo de incubación sobre la lipoperoxidación inducida por el sistema oxidativo Fe <sup>3+</sup> /ascorbato en filetes de trucha arcoiris                                      | Pág. 21 |
| Figura 7 | Inhibición de la Lipoperoxidación inducida por el sistema oxidativo Fe <sup>3+</sup> /ascorbato en filetes de trucha arcoiris. Efecto del matico.  | Pág. 22 |
| Figura 8 | Efecto del tiempo de preincubación del homogeneizado de trucha arcoiris sobre la inhibición de la lipoperoxidación inducida por Fe <sup>3+</sup> /ascorbato.                               | Pág. 24 |
| Figura 9 | Efecto del BHT, matico y romero sobre la disminución del contenido total de tioles inducida por Fe <sup>3+</sup> /ascorbato.   | Pág. 25 |

## ÍNDICE DE TABLAS

|         |   |         |
|---------|---|---------|
| Tabla 1 | IC <sub>50</sub> de BHT, matico y romero obtenidos de los gráficos semilogarítmicos de la lipoperoxidación inducida por Fe <sup>3+</sup> /ascorbato | Pág. 23 |
| Tabla 2 | Cuantificación de polifenoles de BHT, matico y romero   | Pág. 26 |

## RESUMEN

La degradación química de los alimentos es un proceso espontáneo e inducido por efecto de la luz, el calor y la presencia de trazas de algunos iones metálicos de transición, factores que inducen la formación de especies reactivas del oxígeno (ROS). Con el objetivo de preservar los alimentos de la degradación química, la industria alimentaria a utilizado durante años principalmente BHT y BHA; sin embargo, recientes estudios de toxicidad han provocado restricciones de su uso a nivel internacional, lo que ha motivado la búsqueda de sustitutos, cuya inocuidad no pueda ser cuestionada. Una posible alternativa a los antioxidantes sintéticos son los extractos naturales de reconocida actividad antioxidante, la cual estaría dada principalmente por su capacidad de secuestrar radicales libres del oxígeno atribuible principalmente a su alta concentración de polifenoles. Estos antecedentes permiten postular que extractos naturales enriquecidos en polifenoles podrían proteger los alimentos de la degradación química, preservando así sus características nutritivas y organolépticas.

El objetivo de este trabajo fue comparar la capacidad de BHT y los extractos de *Bluddleja globosa* (matico) y *Rosmarinus officinalis* (romero) de proteger los lípidos y el contenido tiólico de filetes de *Oncorhynchus mykiss* (trucha arcoiris). El BHT y los preparados de matico y romero inhibieron la lipoperoxidación y protegieron la disminución del contenido de tioles de homogeneizados de filetes de trucha arcoiris, ambos fenómenos inducidos por el sistema  $Fe^{3+}$ /ascorbato. Los polifenoles de los antioxidantes serían los principales responsables de la protección del contenido tiólico, mientras que los compuestos o-difenoles-diterpénicos serían los responsables principales de la actividad antilipoperoxidante. Cabe señalar que estos principios activos naturales poseen efectos benéficos para la salud humana y animal. Por lo tanto, preparados enriquecidos en polifenoles y o-difenoles-diterpénicos no sólo actuarían como antioxidantes de alimentos, sino además, podrían contribuir a mejorar la calidad de vida de los consumidores.



## Summary

**Hydroalcoholic extract of *Bluddleja globosa* and dry extract of *Rosmarinus officinalis* as preserving agents of *Oncorhynchus mykiss* stake.** Chemical degradation is a spontaneous and induced process by light, heat and the presence of metallic ions traces, factors which induce the formation of oxygen reactive species (ROS). To preserve foods from chemical degradation, food industries have used for a long time principally BHT and BHA; however, toxicity studies recently have been published and the international use of these antioxidants are under study. A possible alternative to replace BHT and BHA could be the use of natural extracts as preserving agents. Natural extracts have antioxidant properties due to the high poliphenols concentration and their capacity to scavenger oxygen radicals. These data permit postulate that natural extracts enriched in poliphenols compounds may prevent chemical degradation of foods, so preserving their nutritive and organoleptic properties.

The aim of this work was to compared the capacity of BHT, an hydroalacoholic extract of *Buddleja globosa* (matico) and a dry extract of *Rosmarinus officinalis* (romero) to prevent the oxidation of lipids and thiol groups present in *Oncorhynchus mykiss* (rainbow trout) stakes. BHT and the extracts of matico and romero inhibited the lipoperoxidation and prevented the thiol oxidation of *Oncorhynchus mykiss* stakes, both phenomenon induced by  $Fe^{3+}$ / ascorbate. Protection of thiol oxidation seems to be mediated by the poliphenols present in the natural extract, and the antilipoperoxidant action would be mediated by the o-diphenol-diterpene. It is necessary to note that natural active principles induce benefic effects on human and animal health. Thus, natural preparations enriched in poliphenols and o-diphenol-diterpene would act as food antioxidants and besides improving the health of consumers.

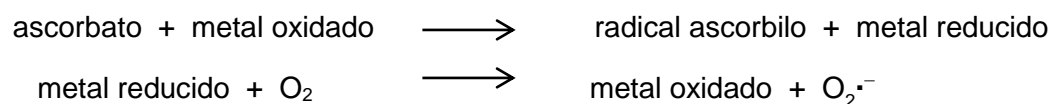
## I. INTRODUCCIÓN

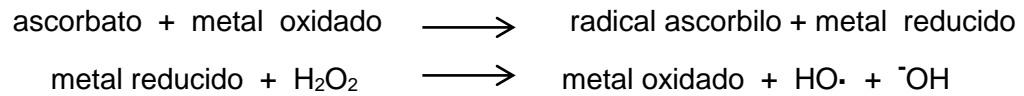
La degradación química de los alimentos es un proceso espontáneo que se produce sin la participación de microorganismos, deteriorando tanto las propiedades organolépticas (olor, sabor) como alimentarias del alimento; corresponde a un proceso principalmente oxidativo inducido por efecto de la luz, el calor y la presencia de trazas de algunos iones metálicos de transición.

La iniciación fotoquímica está dada por la capacidad de la luz UV para activar algunos compuestos desde una configuración electrónica basal a una excitada, lo que puede iniciar oxidaciones radicalarias y no radicalarias (Min y Boff, 2002). Este proceso se ve favorecido por la presencia de ciertos compuestos, denominados fotoestimuladores, como flavinas, porfirinas y quinonas que son fácilmente excitados por luz UV y así transfieren la energía al oxígeno molecular, excitándolo a una configuración de singulete o reduciéndolo a anión superóxido. Los fotoestimuladores excitados también pueden sustraerle átomos de hidrógeno a otras moléculas susceptibles, iniciando así reacciones radicalarias.

El calor genera agitación molecular que produce rompimiento del enlace oxígeno-oxígeno de peróxidos estables presentes en pequeñas cantidades en cualquier sistema que posea lípidos. A temperatura ambiente el proceso es lento, dado que las moléculas con energía cinética suficiente para excitarse durante una colisión corresponden a una fracción muy baja de la población total. Sin embargo, este proceso aumenta notablemente con el incremento de la temperatura.

Por otra parte, metales de transición tales como el hierro y el cobre en su estado iónico, vía la reacción de Haber Weiss y/o Fenton, pueden generar especies radicalarias del oxígeno (Pietta, 2000).





Estos antecedentes muestran que los tres procesos mencionados inducen la formación de especies reactivas del oxígeno (ROS), las cuales serían los agentes oxidantes directos de los componentes de los alimentos. Desde el punto de vista alimentario, los constituyentes más importantes de los alimentos son las proteínas, los carbohidratos, los lípidos, los ácidos nucleicos y las vitaminas.

Las proteínas son en su mayoría más resistentes que otras biomoléculas, a fragmentarse por oxidación (Jiménez y cols., 1997). El anión superóxido y los peróxidos son capaces de activar e inactivar enzimas al reaccionar con metioninas y cisteínas expuestas, pero esta reacción es por lo general reversible (Moller y Kristensen, 2004). Sin embargo, también se ha visto que en presencia de trazas de hierro y cobre en estado iónico, algunos hidroperóxidos derivados de la descomposición de ácidos grasos poseen capacidad de fraccionar oxidativamente proteínas a sus derivados carbonílicos (Hanne y cols., 2000). La degradación irreversible de proteínas se produce principalmente por efecto del radical hidroxilo y el oxígeno singulete.

El radical hidroxilo provoca tanto oxidación fragmentativa como no fragmentativa de las proteínas. En el primer caso el ataque es a los enlaces peptídicos y en el segundo a los grupos R (Dean y cols., 1997; Reznick y Packer, 1992). Algunos ejemplos de oxidación no fragmentativa son: a) Los enlaces peptídicos formados por los aminoácidos prolina o arginina donde la fragmentación de dicho enlace compite con la oxidación del grupo R que se transforma en semialdehído de ácido glutámico. b) Los enlaces peptídicos en los cuales participa tirosina; favoreciéndose la formación de un radical tirosilo el cual puede reaccionar con otro radical hidroxilo para generar dihidroxifenilalanina, que puede seguir propagando reacciones radicalarias. (Morin y cols., 1998). Por otra parte, también pueden reaccionar dos radicales tirosilo de dos hebras diferentes de la proteína para formar ditirosina lo cual provoca polimerización cruzada.

El oxígeno singulete no fragmenta la cadena, sino que oxida selectivamente los grupos R de los aminoácidos triptofano (peroxidación del sustituyente indólico), tirosina (formación del derivado hidroxiquonónico), histidina (endoperoxidación del sustituyente imidazólico), cisteína y metionina (formación de sulfóxidos) y el grupo hem por oxidación de los sustituyentes imidazólicos. (Davies, 2004).

En relación a los carbohidratos, los monosacáridos son muy resistentes a la oxidación radicalaria; sin embargo, los polímeros se fragmentan al reaccionar con el radical hidroxilo. El radical hidroxilo es capaz de atacar los enlaces glicosídicos, generando un compuesto estable y un radical alcoxi intermediario muy reactivo. Este intermediario rápidamente sustrae un átomo de hidrógeno del medio, incluso desde peróxido de hidrógeno, en cuyo caso se genera el radical peroxilo. Así, los carbohidratos pueden ser catalizadores de la oxidación de otras moléculas a través de la generación de dicho radical (Guay y cols., 2002).

Los lípidos presentan una alta reactividad frente a las especies reactivas del oxígeno, ya que poseen dobles enlaces carbono-carbono extremadamente lábiles a la oxidación, tanto radicalaria como no radicalaria (Andia y Street, 1975). En presencia de ROS y oxígeno molecular sufren lipoperoxidación (Aikenss y Dix, 1991) y en presencia de luz UV y oxígeno molecular experimentan fotooxidación (Psomiadou y Tsimidou, 2002). Ambos mecanismos son los responsables del proceso denominado rancidez, que corresponde a la acumulación de aldehídos, cetonas y peróxidos de bajo peso molecular que alteran las propiedades organolépticas y alimentarias del alimento.

Los ácidos nucleicos sufren un proceso de oxidación distinto, donde prima la incorporación de especies reactivas a las bases nitrogenadas. La fotooxidación se produce en forma directa por una incorporación selectiva del oxígeno singulete a la guanina para formar preferencialmente 8-oxo-desoxiguanosina (Ravanat y cols., 2000). Con respecto a la oxidación radicalaria, todas las bases nitrogenadas de los ácidos nucleicos son atacadas por el radical hidroxilo (Marnett, 2000). Por otra parte, los productos de la oxidación química de otras biomoléculas, como el malondialdehído,

también pueden reaccionar con las bases nitrogenadas dañándolas de manera poco selectiva (Marnett, 2000; Morin y cols., 1998).

Las vitaminas a diferencia de las biomoléculas anteriores, corresponden a un grupo muy variado de compuestos que no se relacionan estructuralmente entre sí y que por tanto, reaccionan de manera muy distinta frente a las ROS, algunos ejemplos son:

Vitamina C: El ácido ascórbico se oxida de manera reversible frente a la presencia de ROS, actuando como antioxidante, pero en presencia de trazas de iones metálicos de transición, como hierro o cobre puede actuar como un potente prooxidante (Pietta, 2000).

Vitamina E: El  $\alpha$ -tocoferol puede sufrir fotooxidación mediada por oxígeno singulete, actuando como apagador químico de esta especie (Psomiadou y Tsimidou, 2002). El  $\alpha$ -tocoferol también puede sufrir oxidación radicalaria reversible (grupo fenólico), comportándose como un excelente antioxidante (Palamanda y Kehrer, 1992; Thornalley y Vasak, 1985).

Vitamina A: El retinol se obtiene de la fragmentación del  $\beta$ -caroteno que es un compuesto exógeno que no se fotooxida, actuando como un buen apagador físico del oxígeno singulete (Psomiadou y Tsimidou, 2002). Por otra parte, el  $\beta$ -caroteno también posee una excelente actividad antioxidante, secuestrando lipoperóxidos y otros radicales del oxígeno.

La degradación química no sólo deteriora las propiedades organolépticas de los alimentos, sino también, puede generar compuestos oxidados, tóxicos para el consumo humano y animal. Más aún, estos compuestos pueden ya sea *per se* inducir toxicidad o bien por biotransformación generar metabolitos tóxicos e inducir estrés oxidativo.

Un consumo elevado de proteínas y lípidos oxidados conlleva a una alta concentración de ROS, las cuales pueden sobrepasar la capacidad antioxidante celular y provocar estrés oxidativo. Esta condición celular puede generar retraso en el crecimiento, daño

celular del hígado y riñón, e incluso la muerte (Andia y Street, 1975). Se puede producir además, disminución del hematocrito y de la capacidad total de unión de hierro a hemoproteínas. Por último, la incorporación de lípidos peroxidados a lipoproteínas de baja densidad (LDL), facilita su unión al endotelio vascular, y su posterior auto-oxidación, induciendo la formación de la placa aterómica (Meera y cols., 2000).

Las bases nitrogenadas oxidadas pueden ser incorporadas a polímeros en formación, generando daños a nivel estructural y funcional. Así, en mitocondrias se ha visto que las mutaciones a nivel de los genes de las enzimas que remueven nucleótidos oxidados de los ácidos nucleicos, comprometen la viabilidad celular (Nakabeppu, 2001).

La degradación oxidativa de las vitaminas no sólo altera su función biológica, sino que también puede generar compuestos tóxicos e inductores de reacciones radicalarias (Psomiadou y Tsimidou, 2002).

### **Capacidad antioxidante celular**

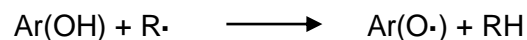
Si bien, existe creciente reconocimiento de que ciertas especies reactivas del oxígeno y algunas biomoléculas oxidadas pueden participar en procesos de interés fisiológico (Ejemplo: respuesta inmune, inflamación, acciones bactericida, viricida, vasopresora, regulatoria de la expresión de ciertos genes, etc.), bajo condiciones de generación excesiva, como ocurre en el consumo de alimentos mal preservados y/o de remoción deficiente de dichas especies, éstas pasan a ejercer efectos dañinos en la célula. Ello a través de la inducción de modificaciones oxidativas de las macromoléculas biológicas que provocan alteraciones de sus funciones celulares (Neuzil y cols., 1993; Wolff y cols., 1986).

El exceso de especies reactivas del oxígeno y biomoléculas oxidadas no siempre provoca daño celular, debido a que existen diferentes mecanismos de defensa enzimáticos y no enzimáticos conducentes, ya sea, a prevenir la propagación radicalaria y/o a reparar o remover los productos de oxidación formados. Entre los

mecanismos enzimáticos podemos mencionar a la superóxido dismutasa (SOD), que cataliza la dismutación del anión superóxido a agua oxigenada; la GSH-peroxidasa, que reduce los radicales hidroperóxidos a alcoholes y la catalasa, que reduce agua oxigenada a H<sub>2</sub>O (Greenwald, 1990). Entre los mecanismos no enzimáticos destacan sustancias antioxidantes tales como el GSH (glutati3n reducido) y la vitamina E (Palamanda y Kehrer, 1992; Thornalley y Vasak, 1985).

**Antioxidantes de origen natural:** Los extractos naturales se han utilizado mayoritariamente con fines terapéuticos. Estos extractos están constituidos por diversos compuestos de diferente naturaleza química; polifenoles, isoprenoides, compuestos ti3licos, ácido asc3rbico y polisacáridos que en conjunto contribuyen, bajo diferentes mecanismos, a ejercer la capacidad antioxidante característica de un preparado natural. La presencia y proporci3n de ellos en los preparados naturales, dependerá principalmente de la planta utilizada como materia prima y del solvente utilizado en la extracci3n. Estos compuestos, además de su rol preservante del alimento, pueden actuar como antioxidantes biol3gicos en el consumidor, a trav3s de diferentes mecanismos.

**1. Polifenoles** (flavonoides, catequinas, antocianidinas, etc.). Estos compuestos son oxidados por radicales libres (R•), dando lugar a un radical más estable y por lo tanto, menos reactivo.



Los flavonoides además, inhiben diversas enzimas responsables de la producci3n de anión superóxido; entre ellas la xantina-oxidasa, la ciclooxigenasa (COX), la succinoxidasa y la NADH oxidasa mitocondriales (Pietta, 2000).

**2. Ácido ascórbico.** Se encuentra presente en muchas plantas, y su acción antioxidante está dada por: a) su capacidad de secuestrar especies radicalarias del oxígeno ( $O_2^{\cdot-}$ ,  $HO^{\cdot}$ ,  $ROO^{\cdot}$ ) y del nitrógeno ( $R-NOO^{\cdot}$ ) y b) por su capacidad de proteger las defensas antioxidantes celulares; regenera las especies oxidadas de los antioxidantes fisiológicos ( $\alpha$ -tocoferol y GSH) y no fisiológicos ( $\beta$ -caroteno).

**3. Isoprenoides.** Son sustancias altamente liposolubles y por lo tanto se distribuyen en zonas de la célula con mayor lipofilicidad. Ellos actúan como antioxidantes, principalmente atrapando los radicales  $ROO^{\cdot}$ . Además, algunos terpenoides de estructura semejante al ácido araquidónico inhiben la COX (García-Pineros y cols., 2001).

**4. Polisacáridos.** Estos compuestos en sus formas oligoméricas o poliméricas tienen la posibilidad de unirse a membranas biológicas a través de interacciones de puentes de hidrógeno o dipolares, provocando una protección física que evita el contacto directo de los oxidantes con los componentes de dichas membranas. Un ejemplo de este tipo de interacciones está constituido por el efecto protector de los mucílagos de la *Opuntia sp.* (Loro y cols., 1999).

**5. Sustancias quelantes.** Estos compuestos son en general ácidos carboxílicos y polifenoles; ellos quelan elementos trazas, principalmente cobre y hierro en su estado iónico, los cuales están involucrados en la producción de radicales libres vía la reacción de Haber Weiss / Fenton (Pietta, 2000).

**6. Compuestos tiólicos.** Existen algunas plantas que concentran particularmente compuestos tiólicos y muy fundamentalmente cisteína. Es reconocida la capacidad de los grupos tiólicos de atrapar radicales libres en forma similar a lo que ocurre con los compuestos fenólicos (Horie y cols., 1992).



### ***Buddleja globosa* (matico).**

La *Buddleja globosa* o matico es una planta rica en compuestos polifenólicos de reconocida capacidad antioxidante, cuyo uso es muy común en la medicina popular. Así, las infusiones de matico son utilizadas en la cicatrización de heridas y de úlceras internas y externas. Por otra parte, se ha demostrado que el matico posee actividad antibacteriana la cual es atribuible a los glicósidos presentes en las hojas de la planta (Pardo y cols., 1993; Pardo y cols., 1997). Además el matico ha presentado actividad antiinflamatoria *in vitro*, inhibiendo tanto la ciclooxigenasa (COX) como la lipooxigenasa (LOX) (Liao y cols., 1999). Los estudios de toxicidad aguda del extracto metanólico global y de citotoxicidad en distintas líneas tumorales, dieron resultados negativos en ambos (Vargas y cols., 2000).

### ***Rosmarinus officinalis* (romero).**

El *Rosmarinus officinalis* (romero) es una planta que posee un uso ancestral como especia. Así, extractos producidos a partir de sus hojas están generando interés en la industria alimentaria a raíz de sus propiedades antioxidantes (Masson y cols., 2005). En general sus principios activos mas abundantes son compuestos o-difenoles-diterpénicos, entre los que destacan el ácido carnósico y el carnosol, que serían responsables de la actividad antioxidante del romero en materias grasas (Bruneton, 2001). En menor proporción presenta polifenoles como el ácido Rosmarínico, que serían responsables de la actividad antioxidante del producto en sistemas acuosos (Masson y cols. 2005). A pesar de que la utilización de hierba seca de romero como especia preservante de productos cárneos está ampliamente distribuida, la investigación actual de productos derivados de esta planta está mas orientada a la preservación de materias grasas (Hall y cols., 1998).

### **Antioxidantes sintéticos.**

El terbutil-hidroxi-anisol (BHA) y terbutil-hidroxi-tolueno (BHT) son los antioxidantes sintéticos más comúnmente usados, con una gran eficacia en la preservación de alimentos. Su uso ha sido parcialmente restringido debido a potenciales efectos indeseables, que actualmente son motivo de controversia (National Toxicology

Program, 2002; Saito y cols., 2003). A nivel mundial, existe un fuerte interés en investigar nuevas fuentes naturales de antioxidantes para su uso terapéutico. Sin embargo, hasta el momento, existe escasa investigación sobre la utilización de estos productos como preservantes de alimentos. Al respecto podemos mencionar que productos formulados a partir del romero aparecen como una buena alternativa para uso en la preservación de alimentos cárneos y aceites (Bruneton, 2001).

Los antioxidantes cumplen un rol fundamental en la industria alimentaria al evitar la degradación química de los alimentos, conservando las propiedades organolépticas y alimentarias del alimento por largos períodos, minimizando el daño generado a las biomoléculas. Desde el punto de vista químico, la actividad antioxidante de los polifenoles presentes en los preparados naturales (flavonoides, flavonas, flavonoles, antocianos, etc.), está representada principalmente por su capacidad de atrapar radicales libres, especialmente del oxígeno. Los antioxidantes sintéticos, BHT y BHA también poseen un grupo fenólico en su estructura, por lo tanto los mecanismos antioxidantes de estos compuestos sintéticos, serían similares a los de los polifenoles naturales. Sin embargo, los polifenoles naturales son en su mayoría extraídos en solventes polares tales como agua o mezclas hidroalcohólicas; en cambio BHT y BHA son compuestos altamente lipofílicos y por tanto requieren ser solubilizados en solventes orgánicos o aceites vegetales. Es un hecho reconocido que los solventes orgánicos apolares son altamente tóxicos para los mamíferos, lo cual limita los usos como protectores antioxidantes de biomoléculas presentes en alimentos de estos compuestos. Más aun, como se mencionó anteriormente, el uso de BHT y BHA como preservantes de alimentos está cuestionado por sus posibles efectos tóxicos (National Toxicology Program, 2002; Saito y cols., 2003).

En este trabajo comparamos la capacidad antioxidante de un extracto hidroalcohólico de *Bluddleja globosa*, un extracto seco de *Rosmarinus officinalis* y BHT. La capacidad antioxidante fue determinada a través de sus capacidades de proteger los lípidos de un homogeneizado total de *Oncorhynchus mykiss* y su contenido de tioles (grupos -SH preferentemente de origen proteico).

## HIPÓTESIS

Los extractos hidroalcohólico de *Bluddleja globosa* y seco de *Rosmarinus officinalis* son capaces de evitar la descomposición oxidativa de los lípidos y de los grupos tiólicos presentes en filetes de *Oncorhynchus mykiss*, de manera similar al BHT.

Si nuestro postulado es verdadero, estos extractos podrían ser utilizados para preservar las características organolépticas y alimenticias de filetes de *Oncorhynchus mykiss* en forma similar al BHT y BHA. Estos extractos aportarían además efectos benéficos para la salud humana dado sus reconocidas propiedades relacionadas con el control de stress oxidativo asociado a diferentes patologías.

## OBJETIVOS

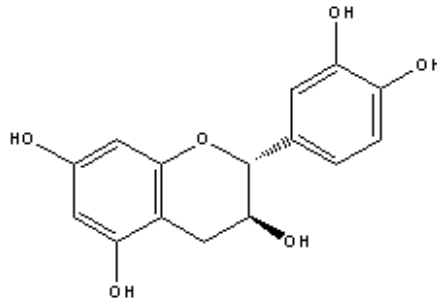
### Objetivo General

Estudiar comparativamente la preservación de muestras de filete de *Oncorhynchus mykiss* (trucha arcoiris) inducida por un extracto hidroalcohólico de *Bluddleja globosa*, un extracto seco de *Rosmarinus officinalis* y BHT, como agentes antioxidantes.

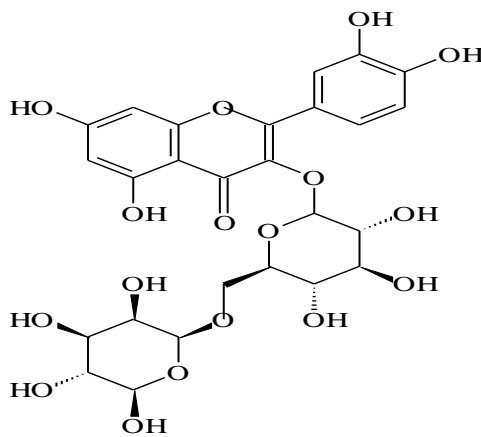
### Objetivos Específicos

1. Estudiar los efectos lipoperoxidantes inducidos por la degradación espontánea generada en presencia de aire y temperatura, y aquella inducida por el sistema prooxidante  $Fe^{3+}$ / ascorbato, generador de especies radicalarias del oxígeno, sobre filetes de *Oncorhynchus mykiss*.
2. Determinar los efectos antilipoperoxidantes de: BHT, un extracto hidroalcohólico de *Bluddleja globosa* y un extracto seco de *Rosmarinus officinalis* sobre la lipoperoxidación espontánea e inducida por el sistema  $Fe^{3+}$ / ascorbato en filetes de *Oncorhynchus mykiss*.
3. Estudiar el efecto del tiempo de preincubación del homogeneizado de filetes de *Oncorhynchus mykiss* con los antioxidantes en estudio, previo a la adición del  $Fe^{3+}$ / ascorbato, sobre el efecto lipoperoxidante de este sistema en filetes de *Oncorhynchus mykiss*.
4. Estudiar el efecto de BHT, el extracto hidroalcohólico de *Bluddleja globosa* y el extracto seco de *Rosmarinus officinalis* sobre la disminución del contenido tiólico de muestras de filete de *Oncorhynchus mykiss* inducida por  $Fe^{3+}$ / ascorbato.
5. Determinar el contenido de polifenoles del extracto hidroalcohólico de *Bluddleja globosa* y el extracto seco de *Rosmarinus officinalis* medido como  $\eta$ moles de catequina y rutina.

Catequina: [(+) – cianidol – 3 - (2R, 3S) - 2-(4,4-dihidroxifenil) - 3,4-dihidro - 1(2H)-benzopiran - 3,5,7-triol - (+) - trans-3,3',4',5,7 - pentahidroflavona)].



Rutina: 4H-1-Benzopiran-4-ona, 3-[[6-O-(6-deoksi-alfa-L-manopiranosil)-beta-D-glucopiranosil-oxi]-2-(3,4-dihidroxifenil)-5,7-dihidroxi-; Rutin; Rutin trihidrato; Rutosido;



## II. MATERIALES Y MÉTODOS

### Reactivos

El reactivo de Folin-Ciocalteu-fenol; el tartrato de sodio y potasio; el ácido tiobarbitúrico (TBA); el ácido tricloroacético (TCA); el ascorbato de sodio; el cloruro férrico, el dimetil-sulfóxido (DMSO) y la rutina: 4H-1-Benzopiran-4-ona, 3-[ [6-O-(6-deoxi - alfa-L-manopiranosil) - beta-D-glucopiranosil-oxi] – 2 - (3,4dihidroxifenil) - 5,7-dihidroxi -; Rutin; Rutin trihidrato; Rutosido; se obtuvieron de Merck Chile.

La albúmina de bovino fracción IV, el ácido 5,5-ditiobis-2-nitrobenzoico (DTNB) y la catequina [(+) – cianidol - 3 - (2R, 3S) - 2-(4,4-dihidroxifenil) - 3,4-dihidro - 1(2H) - benzopiran - 3, 5, 7-triol - (+) - trans-3,3',4',5,7 - pentahidroxiflavona)] (catequina) se obtuvieron de Sigma Chemical Co.

El extracto hidroalcohólico estandarizado de *Bluddleja globosa* y el extracto seco de *Rosmarinus officinalis* fueron donados por Laboratorios Ximena Polanco. Un Kg de droga vegetal (hoja seca) rindió 7,18 L de extracto hidroalcohólico de *Bluddleja globosa*; a su vez, un Kg de droga vegetal (hoja seca) de *Rosmarinus officinalis* rindió a 4,82 L de extracto hidroalcohólico y 1 L de este extracto rindió 34,6 g de extracto seco. El extracto hidroalcohólico de *Bluddleja globosa* y el extracto seco de *Rosmarinus officinalis* fueron los utilizados en nuestro estudio.

El BHT se obtuvo de la empresa Mathiesen S.A.C. distribuidora de insumos alimenticios, que lo comercializa bajo el nombre de IONOL CP.

Todos los reactivos generales fueron de calidad p.a.

## **Animales de experimentación**

Se utilizaron hembras de *Oncorhynchus mykiss*, adultos jóvenes de aproximadamente 1,7 Kg de peso, sin pigmentar. Estos animales se obtuvieron del vivero de la Granja educativa de Lonquén en Isla de Maipo, R.M.

## **Métodos**

- 1. Homogeneizado de filetes de *Oncorhynchus mykiss*.** Los animales fueron mantenidos en ayunas durante 24 horas antes de ser eutanasiados. Posteriormente se les realizó un corte ventral longitudinal, se evisceraron, se les cortó la cola y se les quitó la piel. La musculatura segmentada fue cortada en trozos cuyos pesos fluctuaron entre 5 y 10 gamos y guardada en frascos independientes a  $-20\text{C}^{\circ}$  hasta su uso. Los trozos fueron homogeneizados en amortiguador fosfato 50 mM, pH 7,4 durante 2 min a 25.000 rpm, utilizando un ultraturrax Janke and Kunkel modelo T25. La proteína de los homogeneizados se determinó por el método de Lowry y cols., (1951), utilizando albúmina de bovino, fracción IV como estándar.
- 2. Lipoperoxidación.** La lipoperoxidación se estimó midiendo las sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico por la técnica descrita en Letelier y cols., (2004). El malondialdehído generado como producto de la descomposición de los lipoperoxidos formados, reacciona con el ácido tiobarbitúrico dando lugar a un conjugado, el cual posee una absorbancia máxima a 532 nm y su coeficiente de extinción es  $156 \text{ mM}^{-1} \times \text{cm}^{-1}$ .

La mezcla de reacción contenía (concentraciones finales) en un volumen de 1,0 mL; amortiguador fosfato de potasio 50 mM, pH 7,4; homogeneizado total de trucha arcoiris 1 mg de proteína/ mL; diferentes concentraciones de extracto hidroalcohólico (1 – 10  $\mu\text{L}$ / mL), de extracto seco de romero (1 - 3,2  $\mu\text{g}$ / mL) y de BHT (0,1 – 12  $\mu\text{M}$ );  $\text{FeCl}_3$  600  $\mu\text{M}$ ; ascorbato 1 mM. Los blancos contenían todos los reactivos a excepción del homogeneizado total. Luego se incubaron durante 10 min a  $37^{\circ}\text{C}$  en un baño termorregulado Julabo modelo SW-21C, con agitación

constante. Al cabo de este período, las proteínas se precipitaron agregando 500  $\mu\text{L}$  de TCA 20% P/V en frío ( $4^{\circ}\text{C}$ ). Luego, las muestras se centrifugaron a  $9.000 \times g$  durante 10 min a  $4^{\circ}\text{C}$ ; alícuotas de 500  $\mu\text{L}$  de los sobrenadantes se mezclaron con 500  $\mu\text{L}$  de TBA 1% P/V y se incubaron durante 60 min a  $50^{\circ}\text{C}$  con agitación constante, para desarrollar la reacción colorimétrica. Al cabo de este período, se leyó la absorbancia de las muestras a 532  $\eta\text{m}$  contra sus blancos respectivos, en un espectrofotómetro ATI UNICAM modelo UV 3, acoplado a un computador.

- 3. Determinación de tioles totales:** La medición de los tioles totales se realizó de acuerdo a la técnica descrita en Letelier y cols., (2004). 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  $\eta\text{m}$  y su coeficiente de extinción es  $13.600 \text{ M}^{-1} \times \text{cm}^{-1}$ .

La mezcla de reacción contenía los reactivos siguientes en concentraciones finales (en un volumen de 1,0 mL): amortiguador fosfato de potasio 50 mM, pH 7,4; homogeneizado total de filete de trucha arcoiris, 1,0 mg de proteína/ mL; concentraciones de los extractos naturales y BHT, equivalentes a los  $\text{IC}_{50}$  determinados en los experimentos de lipoperoxidación;  $\text{FeCl}_3$  600  $\mu\text{M}$ ; ascorbato 1 mM; DTNB 0,6 mM. Los blancos contenían todos los reactivos, a excepción del homogeneizado de trucha arcoiris.

El homogeneizado de filete fue preincubado con los diferentes antioxidantes durante 10 min en un baño termorregulado Julabo modelo SW-21C a  $37^{\circ}\text{C}$  con agitación constante. A continuación se adicionó el  $\text{FeCl}_3$  y el ascorbato y nuevamente se incubaron las mezclas durante 10 min a  $37^{\circ}\text{C}$ . Luego, se adicionó el DTNB a las mezclas y se incubaron nuevamente durante 60 min a  $37^{\circ}\text{C}$  en un baño termorregulado con agitación constante. Al cabo de este período las muestras se centrifugaron a  $9.000 \times g$  durante 10 min en una centrífuga refrigerada ( $4^{\circ}\text{C}$ ) Heraeus Biofuge 15R, con el objeto de decantar las proteínas. Las absorbancias de



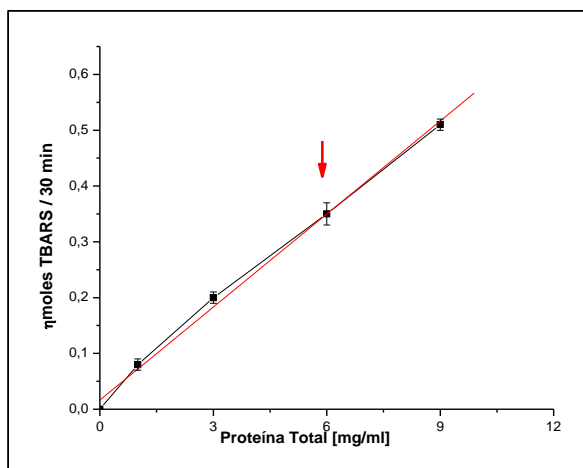
los sobrenadantes de las muestras se leyeron a 412 nm en un espectrofotómetro ATI UNICAM modelo UV 3 acoplado a un computador, utilizando para ello sus blancos respectivos. El contenido de tioles fue expresado en nmoles de tioles/ mg de proteína total.

- 4. Cuantificación de polifenoles totales.** La determinación de polifenoles totales se realizó de acuerdo al método de Price y cols., 1989. La cuantificación de los polifenoles presentes en los extractos analizados se realizó utilizando una dos soluciones estándar una de catequina y otra de rutina. La mezcla de reacción contenía (concentraciones finales) en un volumen de 5,0 mL: antioxidantes: extracto hidroalcohólico de matico (1 y 2 µL), extracto seco de romero, 20 y 40 µg; BHT, 100 y 200 nmoles; reactivo de Folin, 250 µL; Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 20% P/V, 750 µL; agua desionizada, c.s.p. completar 5 mL. El blanco contenía todos los reactivos a excepción del antioxidante ensayado. La mezcla del antioxidante y H<sub>2</sub>O desionizada se agitó vigorosamente; luego se adicionó el Folin y se agitó nuevamente durante 5 min. Al cabo de este período, se adicionó el Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> y se agitó nuevamente. Posteriormente se dejó la mezcla reposar durante 2 horas en oscuridad y al cabo de este período se leyó la absorbancia de las muestras a 760 nm contra sus blancos respectivos, en un espectrofotómetro ATI UNICAM modelo UV 3, acoplado a un computador.
- 5. Análisis estadístico.** Los resultados están expresados como el promedio de los valores obtenidos de cada experimento ± las desviaciones estándar de las observaciones de las muestras en relación con sus promedios. Para establecer significancia estadística de los resultados se utilizó test de t-Student para datos pareados; exigiéndose en cada caso un 95% de certeza. Con el fin de establecer si las diferencias entre los grupos ensayados eran estadísticamente significativas, se utilizó el test de t-Student para poblaciones independientes.

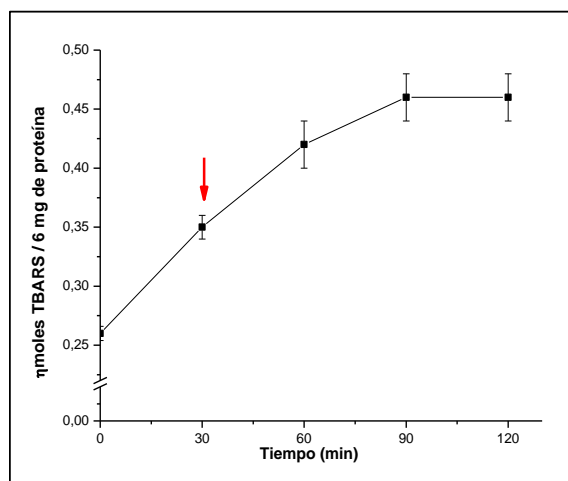
### III. RESULTADOS

**Lipoperoxidación espontánea.** Homogeneizados de trucha arcoiris fueron ensayados en función de la concentración de proteína y del tiempo de incubación, con el objeto de determinar las condiciones de linealidad y así, establecer los IC<sub>50</sub> de los antioxidantes en estudio (BHT, extracto hidroalcohólico de matico y extracto seco de romero). Estos resultados se muestran en las figuras 1 y 2. La lipoperoxidación tuvo un comportamiento lineal respecto de la concentración de proteína del tejido homogeneizado como lo muestra la figura 1. En relación al tiempo de incubación de las muestras, la lipoperoxidación fue lineal hasta los 45 min aproximadamente, como lo muestra la figura 2. Las condiciones elegidas para realizar los estudios de capacidad antioxidante de los extractos naturales y BHT, se eligió 6 mg de proteína del homogeneizado/ mL y 30 min de incubación, valores que están señalados con una flecha en los gráficos respectivos (figura 1 y 2).

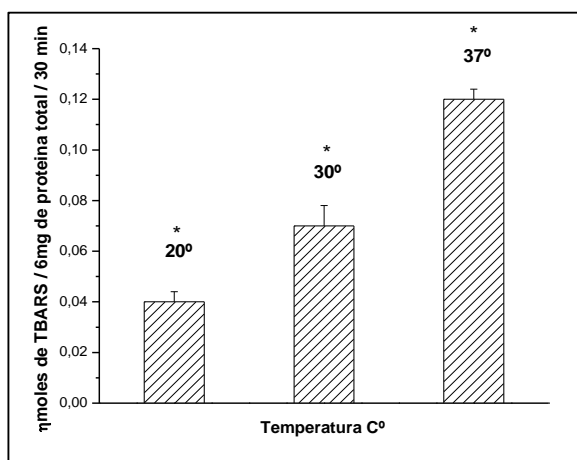
La figura 3 muestra el efecto de la temperatura sobre la lipoperoxidación espontánea del homogeneizado de filete de trucha arcoiris. Al preincubar el homogeneizado durante 30 min a temperaturas crecientes (20°C, 30°C y 37°C) se observó un aumento estadísticamente significativo de la lipoperoxidación espontánea ( $p < 0,05$ ). Este aumento responde exactamente al Q<sub>10</sub> esperado para una reacción química, es decir, la velocidad de reacción se duplica ( $v$ :  $\eta$ moles de TBARS/ 6 mg de proteína/ 30 min). Los TBARS basales, obtenidos de las muestras sin incubar fueron 0,24  $\eta$ moles/ 6 mg de proteína; este valor fue restado a los valores de las muestras incubadas durante 30 min a distintas temperaturas, para obtener las diferencias presentadas en la figura 3.



**Figura 1. Lipoperoxidación espontánea de filetes de trucha arcoiris. Curva de Proteína.** Diferentes concentraciones de homogeneizado total (mg de proteína/ mL) fueron incubadas a 37°C durante 30 minutos para evaluar la lipoperoxidación, de acuerdo a lo descrito en Métodos. La flecha indica la concentración de proteína elegida para realizar los experimentos posteriores. Los valores representan la media de al menos 4 experimentos independientes  $\pm$  su desviación estándar.

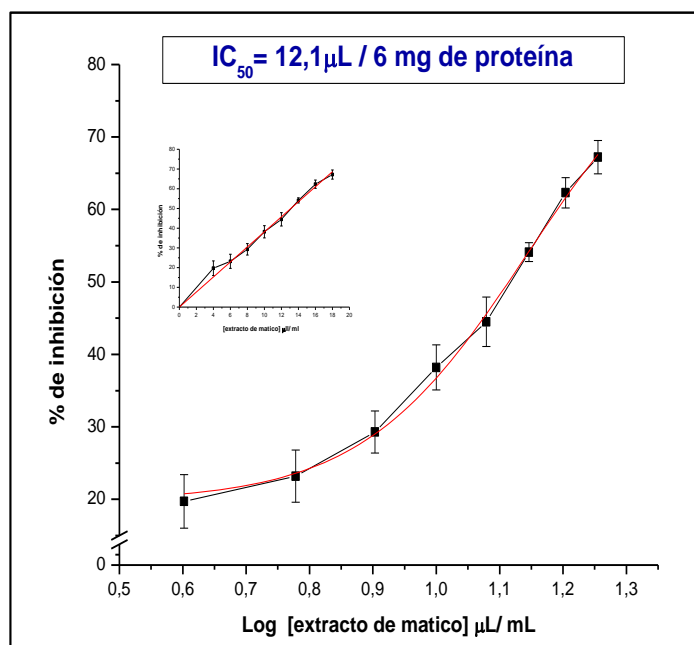


**Figura 2. Efecto del tiempo de incubación sobre la lipoperoxidación espontánea de filetes de trucha arcoiris.** El homogeneizado total (6 mg de proteína/ mL) fue incubado a 37°C para determinar la lipoperoxidación, de acuerdo a lo descrito en Métodos. La flecha indica el tiempo de incubación elegido para realizar los experimentos posteriores. Los valores representan la media de al menos 4 experimentos independientes  $\pm$  su desviación estándar.



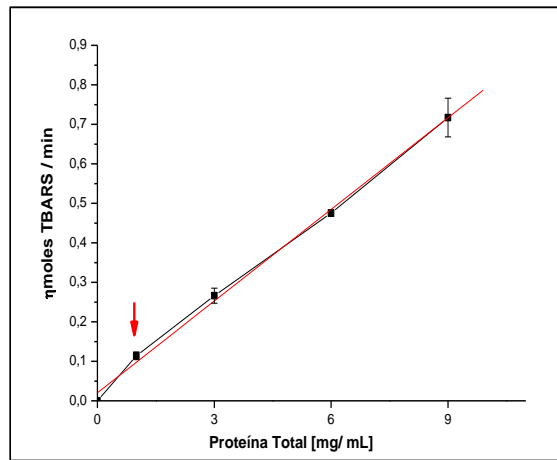
**Figura 3. Efecto de la temperatura de incubación sobre la lipoperoxidación espontánea de filetes de trucha arcoiris.** El homogeneizado total (6 mg de proteína/ mL) fue incubado durante 30 minutos para determinar la lipoperoxidación espontánea, de acuerdo a lo descrito en Métodos. Los valores representan la diferencia entre los valores obtenidos después de 30 min de incubación y aquel obtenido a tiempo cero para cada una de las temperaturas ensayadas. Estos valores representan la media de al menos 4 experimentos independientes  $\pm$  su desviación estándar. \*: Diferencias estadísticamente significativas ( $p < 0,05$ ).

En la figura 4 se muestra el efecto del extracto hidroalcohólico de matico sobre la inhibición de la lipoperoxidación espontánea (en ausencia de  $Fe^{3+}$ / ascorbato) de homogeneizados de filetes de trucha arcoiris. En él está graficado el porcentaje de inhibición de la lipoperoxidación espontánea vs el logaritmo de la concentración del extracto expresada en  $\mu$ L de extracto/ mL de mezcla de reacción. El gráfico inserto corresponde al gráfico directo: % de inhibición vs  $\mu$ L de extracto/ mL. El extracto de matico inhibió la lipoperoxidación de una forma concentración-respuesta; el  $IC_{50}$  (concentración que inhibió el 50% la lipoperoxidación espontánea) calculado del gráfico semilogarítmico fue 12,1  $\mu$ L/ 6 mg de proteína.

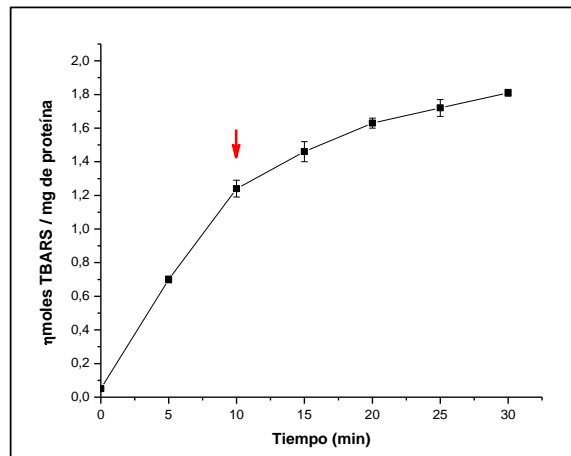


**Figura 4: Inhibición de la lipoperoxidación espontánea de filetes de trucha arcoiris. Efecto del matico.** El homogeneizado total (6 mg de proteína/ mL) fue incubado durante 30 min a 37°C, antes de determinar la lipoperoxidación, de acuerdo a lo descrito en Métodos. Los valores representan la media de al menos 4 experimentos independientes  $\pm$  su desviación estándar. El gráfico inserto corresponde al gráfico directo: % de inhibición vs  $\mu\text{L}$  de extracto/ mL.

**Lipoperoxidación de filetes de trucha arcoiris inducida por  $\text{Fe}^{3+}$ / ascorbato. Efecto de la concentración de proteína y del tiempo de incubación.** La lipoperoxidación presentó un comportamiento lineal respecto de la concentración de tejido homogeneizado, expresada como concentración de proteína (figura 5). En relación al tiempo de incubación, la linealidad se mantuvo hasta los 10 minutos (figura 6). Las condiciones de linealidad elegidas para realizar los experimentos posteriores fueron 1mg de proteína/ mL y 10 min de incubación de las muestras con el sistema  $\text{Fe}^{3+}$ /ascorbato. Estas condiciones están señaladas con una flecha en los gráficos respectivos.

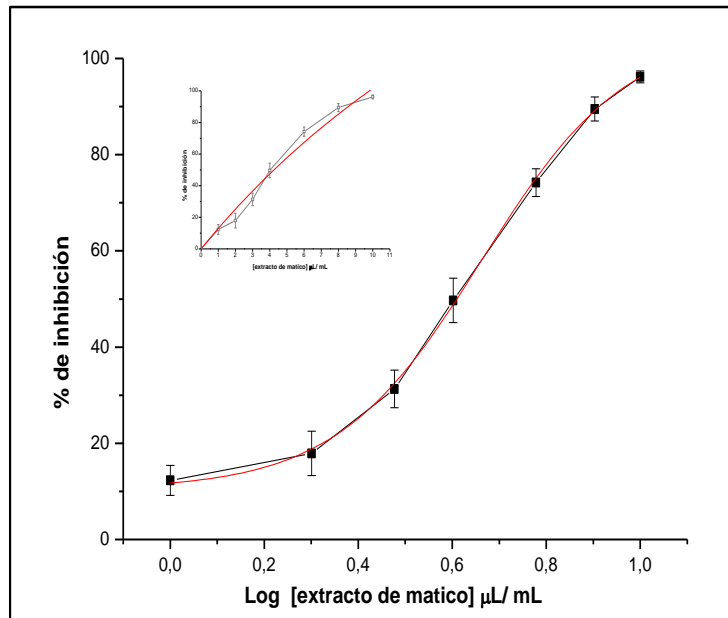


**Figura 5. Lipoperoxidación inducida por el sistema oxidativo  $Fe^{3+}$ / ascorbato en filetes de trucha arcoiris. Efecto de la concentración de homogeneizado, medido como mg de proteína/ mL.** La lipoperoxidación fue determinada de acuerdo a lo descrito en Métodos. La flecha indica la concentración de proteína elegida para realizar los experimentos posteriores. Los valores representan la media de al menos 4 experimentos independientes  $\pm$  su desviación estándar.



**Figura 6. Efecto del tiempo de incubación sobre la lipoperoxidación inducida por el sistema oxidativo  $Fe^{3+}$ / ascorbato en filetes de trucha arcoiris.** [proteína]: 1 mg/ mL. La lipoperoxidación se determinó de acuerdo a lo descrito en Métodos. La flecha indica el tiempo de incubación elegida para realizar los experimentos posteriores. Los valores representan la media de al menos 4 experimentos independientes  $\pm$  su desviación estándar.

**Lipoperoxidación de homogenizado total de filetes de trucha arcoiris inducida por Fe<sup>3+</sup>/ascorbato. Efecto de BHT, matico y romero.** El efecto del extracto hidroalcohólico de matico se muestra en la figura 7; en ella se muestra que la incubación de las mezclas de homogeneizado total, el sistema Fe<sup>3+</sup>/ ascorbato y las distintas concentraciones de matico provocó una inhibición concentración-respuesta de la lipoperoxidación inducida por Fe<sup>3+</sup>/ ascorbato. Similares resultados se obtuvieron con romero y BHT. A partir de los gráficos semilogarítmicos respectivos se calcularon los IC<sub>50</sub> (concentración de antioxidante que inhibe el 50% de la lipoperoxidación inducida por Fe<sup>3+</sup>/ ascorbato) para los 3 antioxidantes ensayados, los cuales aparecen en la tabla 1. Los IC<sub>50</sub> fueron 0,11 ± µg/ mg proteína para BHT; 4,1 ± µL/ mg proteína o 571 µg droga vegetal/ mg de proteína para matico y, 2,3 ± µg/ mg proteína o 13,8 µg droga vegetal/ mg de proteína para romero.



**Figura 7: Inhibición de la Lipoperoxidación inducida por el sistema oxidativo Fe<sup>3+</sup>/ ascorbato en filetes de trucha arcoiris. Efecto del matico.** [proteína]: 1 mg/ mL. La lipoperoxidación fue determinada de acuerdo a lo descrito Métodos. El gráfico inserto corresponde al gráfico directo: % de inhibición vs [matico] µL/ mL. Los valores representan la media de al menos 4 experimentos independientes ± su desviación estándar.

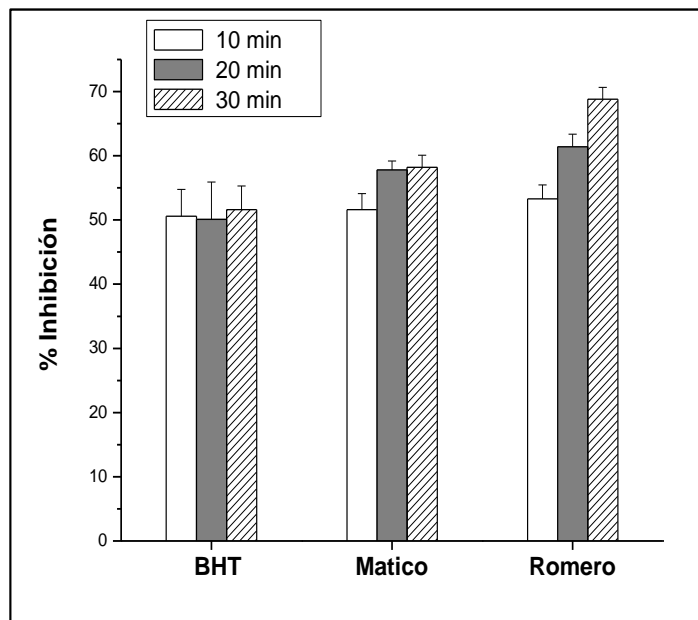
**Tabla 1. IC<sub>50</sub> de BHT, matico y romero obtenidos de los gráficos semilogarítmicos de la lipoperoxidación inducida por Fe<sup>3+</sup>/ ascorbato.**

|                | <b>ηmoles TBARS/ min/<br/>mg proteína</b> | <b>IC<sub>50</sub></b>             |
|----------------|---|------------------------------------|
| <b>Control</b> | 0,153 ± 0,005                             | –                                  |
| <b>BHT</b>     | 0,077 ± 0,007                             | 0,11 µg/ mg proteína               |
| <b>Matico</b>  | 0,077 ± 0,007                             | 4,1 µL/ mg proteína                |
|                |   | 571 µg droga vegetal/ mg proteína  |
| <b>Romero</b>  | 0,077 ± 0,007                             | 2,3 µg/ mg proteína                |
|                |   | 13,8 µg droga vegetal/ mg proteína |

La conversión de los IC<sub>50</sub> a µg droga vegetal se realizó utilizando los antecedentes dados por Laboratorios Ximena Polanco que aparecen en materiales. Los valores representan la media de al menos 4 experimentos independientes ± su desviación estándar.

Dado que la polaridad de los antioxidantes utilizados en nuestro estudio es diferente, tanto el tipo de interacción con las biomoléculas, como la velocidad a la cual ellos interaccionan, debería ser diferente. Es por ello que como una forma de evaluar estas diferencias, medimos el efecto del tiempo de preincubación del homogeneizado de filetes de trucha arcoiris con los antioxidantes en estudio, sobre la inhibición de la lipoperoxidación inducida por Fe<sup>3+</sup>/ ascorbato. Estos resultados se muestran en la figura 8. La preincubación del homogeneizado total de trucha arcoiris durante 10, 20 y 30 min con romero produjo un aumento estadísticamente significativo de la inhibición de la lipoperoxidación inducida por Fe<sup>3+</sup>/ ascorbato (p<0,05). En las mismas condiciones la preincubación del homogeneizado de trucha arcoiris con matico, aumentó levemente entre 10 y 20 min de preincubación (p<0,05), permaneciendo constante a los 30 min. Por otra parte, no se observaron diferencias en los porcentajes de inhibición de la lipoperoxidación inducida por Fe<sup>3+</sup>/ ascorbato al preincubar el homogeneizado total de trucha arcoiris con BHT durante 10, 20 y 30 min.

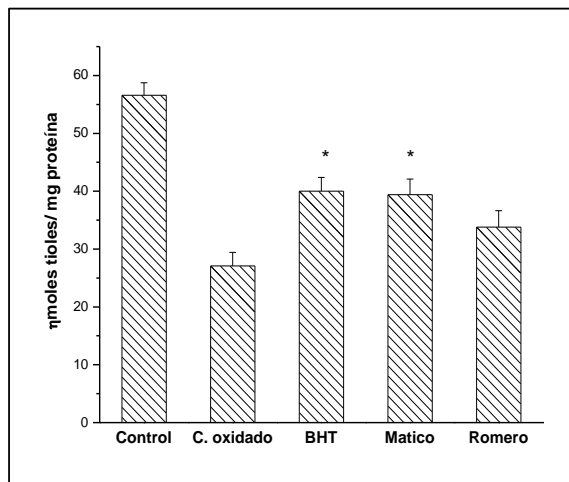




**Figura 8. Efecto del tiempo de preincubación del homogeneizado de trucha arcoiris sobre la inhibición de la lipoperoxidación inducida por  $Fe^{3+}$ /ascorbato.** El homogeneizado de trucha arcoiris fue preincubado con cada uno de los antioxidantes durante los tiempos señalados en la figura, antes de adicionar el  $Fe^{3+}$ /ascorbato. La lipoperoxidación fue determinada de acuerdo a lo descrito en Métodos. Los valores representan la media de al menos 4 experimentos independientes  $\pm$  su desviación estándar.

**Contenido de tioles totales del homogeneizado de trucha arcoiris.** El grupo tiólico (-SH) es el grupo característico de los residuos de cisteína, aminoácido componente de la secuencia aminoacídica de la mayoría de las proteínas. Este grupo posee propiedades redox y puede ser oxidado por diversos agentes oxidantes biológicos y no biológicos. Este proceso oxidativo generalmente provoca cambios en las propiedades organolépticas de los alimentos (olor, sabor). La figura 9 muestra el efecto protector de los antioxidantes en estudio sobre el contenido de tioles totales del homogeneizado de trucha arcoiris en presencia de  $Fe^{3+}$ /ascorbato. Las concentraciones de los agentes antioxidantes utilizadas en estos experimentos fueron las correspondientes a sus  $IC_{50}$  obtenidos de la lipoperoxidación (tabla 1). El sistema  $Fe^{3+}$ /ascorbato produjo una disminución equivalente al 52,1% del contenido de tioles totales del homogeneizado de

trucha arcoiris. Al preincubar el homogeneizado durante 10 min antes de adicionar el  $\text{Fe}^{3+}$ / ascorbato con BHT, matico y romero la disminución de los tioles fue menor, 29,9%, 30,4% y 40,3%, respectivamente.



**Figura 9. Efecto del BHT, matico y romero sobre la disminución del contenido total de tioles inducida por  $\text{Fe}^{3+}$ / ascorbato.** Control: homogeneizado incubado en ausencia de extractos y  $\text{Fe}^{3+}$ / ascorbato; C. oxidado: homogeneizado preincubado con  $\text{Fe}^{3+}$ / ascorbato. El homogeneizado total (1 mg proteína/ mL) fue preincubado con cada uno de los antioxidantes durante 10 minutos a  $37^{\circ}\text{C}$  y posteriormente con  $\text{Fe}^{3+}$ / ascorbato durante 10 minutos antes de determinar el contenido de tioles de acuerdo a lo descrito en Métodos. Los valores representan la media de al menos 4 experimentos independientes  $\pm$  su desviación estándar. \*: Diferencias estadísticamente no significativas ( $p > 0,05$ ).

**Cuantificación de Polifenoles totales.** En general los extractos hidroalcohólicos naturales están enriquecidos en polifenoles (flavonoides, flavonas, flavonoles, antocianos, etc.). El extracto de matico utilizado es un extracto hidroalcohólico y el de romero es un extracto seco proveniente de un extracto hidroalcohólico (ver materiales). Como se mencionó en la introducción, los extractos obtenidos de solventes polares están enriquecidos en polifenoles, por lo tanto, asumimos que la respuesta antioxidante de ambos extractos y la de BHT que es un compuesto altamente lipofílico, debería estar dada principalmente por la capacidad de la función fenólica de atrapar radicales libres del oxígeno. Es por ello que se determinó el contenido de polifenoles de los 3 antioxidantes estudiados. La tabla 2 muestra el contenido de polifenoles totales de

cada uno de los antioxidantes, expresado como  $\eta$ moles de catequina y rutina, compuestos que fueron usados como estándares. Ambos compuestos poseen en su estructura 4 grupos fenólicos, y coincidentemente ambos mostraron igual reactividad frente al reactivo de Folin, es decir, 20  $\eta$ moles de ambos estándares dieron la misma absorbancia. Es por ello que los valores están expresados en  $\eta$ moles de catequina y/o rutina. Por otra parte, dado que el preparado de matico es un extracto hidroalcohólico y el de romero un extracto seco proveniente de una extracto hidroalcohólico (ver materiales) como una forma de homogeneizar los valores de concentración de polifenoles, ellos fueron expresados además, por g de droga vegetal. Estos resultados aparecen en la tabla 2. Las concentraciones de polifenoles de las muestras fueron: 1,11  $\eta$ moles de catequina o rutina/  $\mu$ g de BHT; 21  $\eta$ moles de catequina o rutina/  $\mu$ L de extracto de matico o 150,78  $\mu$ mol de catequina o rutina/ g droga vegetal; 0,51  $\eta$ moles de catequina o rutina/  $\mu$ g de extracto seco de romero o 85,0  $\mu$ mol de catequina o rutina/ g droga vegetal.

**Tabla 2. Cuantificación de Polifenoles de BHT, matico y romero.**

| <b>Antioxidante</b> | <b>[Polifenoles]</b>  |
|---------------------|---|
| <b>BHT</b>          | 1,11 $\pm$ 0,003 mmoles de catequina o rutina / g                                     |
| <b>Matico</b>       | 21,0 $\pm$ 0,37 $\eta$ moles de catequina o rutina / $\mu$ L extracto hidroalcohólico |
|                     | 150,78 $\mu$ mol de catequina o rutina/ g droga vegetal                               |
| <b>Romero</b>       | 0,51 $\pm$ 0,04 $\eta$ moles de catequina o rutina / $\mu$ g extracto seco            |
|                     | 85,0 $\mu$ mol de catequina o rutina/ g droga vegetal                                 |

Los valores expresados por g de droga vegetal fueron calculados a partir de los antecedentes dados por Laboratorios Ximena Polanco que aparecen en materiales. La cuantificación se realizó de acuerdo a lo descrito en Métodos. Los valores representan la media de al menos 4 experimentos independientes  $\pm$  su desviación estándar.

#### IV. DISCUSIÓN

Los resultados de este trabajo, apoyan la hipótesis postulada en la cual se indica que los extractos hidroalcohólico de *Bluddleja globosa* y seco de *Rosmarinus officinalis* son capaces de evitar la descomposición oxidativa de filetes de *Oncorhynchus mykiss* de manera similar al BHT y por tanto, de preservar sus características organolépticas.

Al incubar el homogeneizado de trucha arcoiris (6 mg de proteína/ mL) durante 30 min a 37°C (lipoperoxidación espontánea) se observó la presencia de TBARS en las muestras (figura 4). Cabe señalar que las truchas fueron eutanasiadas, desangradas y fileteadas rápidamente; luego los filetes fueron congelados a -20°C hasta el momento de su utilización. La decapitación provoca isquemia, fenómeno asociado a la generación de especies reactivas del oxígeno, el cual podría ser el responsable del bajo nivel de la lipoperoxidación espontánea observada. Cabe hacer notar que la baja concentración de  $\eta$ moles de TBARS medida en estas condiciones, nos dificultó las mediciones de los efectos antioxidantes de BHT, matico y romero a pesar de que se utilizaron 6 mg de proteína/ mL de mezcla de reacción y 30 min de incubación a 37°C. Es por ello que solamente se presenta el IC<sub>50</sub> para el extracto hidroalcohólico de matico (concentración que inhibió el 50% la lipoperoxidación espontánea de homogeneizado de filetes de trucha arcoiris); este valor fue 12,1 $\mu$ L/ 6 mg de proteína.

Bajo condiciones aeróbicas la degradación química de los alimentos se produce exclusivamente a través de especies reactivas del oxígeno (Min y Boff, 2002), interviniendo tanto especies radicalarias como no radicalarias en distintas proporciones dependiendo del alimento. Para aumentar la lipoperoxidación y así continuar nuestro estudio, se indujo lipoperoxidación con Fe<sup>3+</sup>/ ascorbato, sistema prooxidante generador de especies radicalarias del oxígeno (anión superóxido y radical hidroxilo). En estas condiciones se estandarizó el sistema respecto a la concentración de proteína y el tiempo de incubación para trabajar en condiciones de linealidad. Las condiciones de linealidad seleccionadas fueron 1 mg de proteína, 10 min de incubación y 37°C la temperatura de incubación (figuras 5 y 6). Respecto de la lipoperoxidación espontánea,

el tiempo de incubación disminuyó 3 veces y la concentración de proteína, 6 veces; más aún, la lipoperoxidación medida en  $\eta$ moles de TBARS aumentó 2,5 veces. Los valores de los  $IC_{50}$  obtenidos de la lipoperoxidación inducida por  $Fe^{3+}$ / ascorbato (0,11  $\mu$ g de BHT/ mg de proteína; 571  $\mu$ g de droga vegetal matico/ mg de proteína; 13,8  $\mu$ g de droga vegetal romero/ mg de droga vegetal) mostraron que el BHT sería el mejor inhibidor de la lipoperoxidación inducida por  $Fe^{3+}$ / ascorbato y el romero mejor que el matico (tabla 1).

Dado que el grupo fenólico es el responsable de los efectos antioxidantes del BHT, pensamos que la diferencia en la capacidad antilipoperoxidante de los preparados de matico y romero podría estar representada por la concentración de polifenoles presentes en ellos. Cabe hacer notar que los preparados de matico y romero fueron obtenidos a partir de extractos hidroalcohólicos de sus hojas, los cuales en general, están enriquecidos en polifenoles; por lo tanto se cuantificó la concentración de polifenoles presentes en ambos extractos. Para ello se utilizaron dos estándares, catequina y rutina; ambos estándares poseen en su estructura 4 grupos fenólicos. La concentración de polifenoles de catequina y rutina fue idéntica y además, se necesitó 4 veces la concentración de BHT para igualar la concentración de polifenoles de los estándares de catequina y rutina; la absorbancia de una muestra que contenía 80  $\eta$ moles de BHT fue idéntica a la de los estándares que contenían 20  $\eta$ moles de catequina o rutina medidos en la linealidad de la curva estándar. Estos resultados muestran que los 4 grupos fenólicos de cada uno de los estándares utilizados poseen igual reactividad frente al reactivo de Folin (Price y cols., 1989).

El contenido de polifenoles del matico fue 1,8 veces mayor que el del romero (150,78  $\mu$ mol de catequina o rutina/ g droga vegetal matico vs 85,0  $\mu$ mol de catequina o rutina/ g droga vegetal romero). Por otra parte, al determinar los polifenoles de las concentraciones  $IC_{50}$  (lipoperoxidación) de los extractos naturales, se encontró que el matico tenía 73 veces más polifenoles que el romero (86,1 $\eta$ moles de catequina o rutina/ 4,1  $\mu$ L de extracto hidroalcohólico vs 1,17 $\eta$ moles de catequina o rutina/ 2,3  $\mu$ g de extracto seco de romero) (tabla1 y 2). Sin embargo, los  $IC_{50}$  de la lipoperoxidación expresados como  $\mu$ g de droga vegetal del matico y romero fueron 571  $\mu$ g y 13,8  $\mu$ g

respectivamente, es decir, romero se comportó 41 veces mejor como antilipoperoxidante que matico. No podemos descartar que los fenoles actúen como antilipoperoxidantes ya que desde el punto de vista químico, la función fenólica sería la única responsable de los efectos antioxidantes del BHT. Así, la capacidad antilipoperoxidante de los preparados de matico y romero podría también estar representada, a lo menos en parte, por la concentración de polifenoles presentes en ellos.

Por otra parte, se debe considerar que lo que se mide es la capacidad antiperoxidante de los lípidos constituyentes de las membranas biológicas presentes en el homogeneizado de trucha arcoiris. Por lo tanto, otro factor a considerar es la lipofilidad de los agentes antioxidantes. En este sentido BHT es absolutamente lipofílico y por ello debería interactuar con los lípidos de la membrana más rápidamente que los extractos de romero y matico que provienen de extractos hidroalcohólicos de la droga vegetal. Para probar este postulado nosotros probamos la dependencia de los efectos antilipoperoxidantes con el tiempo de preincubación del homogeneizado de trucha arcoiris con BHT, matico y romero.

La lipoperoxidación observada no dependió del tiempo de preincubación del BHT con el homogeneizado; en el caso de matico, el equilibrio se alcanzó a los 20 min, mientras que en el caso del romero, fue dependiente del tiempo de preincubación hasta los 30 min que fue el mayor tiempo ensayado (figura 8). Estos resultados indicarían que los principios activos presentes en el extracto de romero serían más polares que los del matico. Al respecto existen antecedentes que señalan que la actividad antioxidante de preparados de romero se debería en parte a la presencia de ácido Rosmarínico (polifenol), pero sobretodo a compuestos terpenoides de bajo peso molecular, especialmente los o-difenoles-diterpénicos (solubles en mezclas hidroalcohólicas), cuya eficacia es superior a los antioxidantes sintéticos usados en la actualidad (BHT, BHA) (Bruneton, 2001; Hall y cols., 1998). Cabe señalar que la capacidad antioxidante a la cual se refiere esta referencia está medida como rancidez de aceites a alta temperatura. Los enlaces insaturados de los terpenos podrían interactuar con los radicales libres del oxígeno en forma semejante a los ácidos grasos insaturados; de

esta forma los terpenos y los polifenoles presentes en el extracto de romero podrían prevenir sinérgicamente la lipoperoxidación inducida por  $\text{Fe}^{3+}$ / ascorbato; este postulado podría explicar el mayor efecto antioxidante mostrado por el extracto de romero comparado con el de matico.

Respecto de los cambios oxidativos inducidos por  $\text{Fe}^{3+}$ / ascorbato sobre los grupos tiólicos de las proteínas presentes en el homogeneizado de trucha arcoiris, los tres productos inhibieron parcialmente la disminución del contenido de tioles del homogeneizado de trucha arcoiris. Sin embargo, a concentraciones equivalentes a los  $\text{IC}_{50}$  de la lipoperoxidación, el extracto hidroalcohólico de matico fue dos veces mejor protector del contenido de tioles que el extracto de romero y protegió en igual magnitud que el BHT (figura 9). Cabe recordar que romero fue mejor antilipoperoxidante que matico y por tanto, es claro que deben existir diferencias en la composición y proporción de los principios activos antioxidantes de ambos extractos naturales. Como se mencionó anteriormente, este extracto de romero estaría enriquecido en compuestos terpenoides de bajo peso molecular, como por ejemplo los o-difenoles-diterpénicos solubles en mezclas hidroalcohólicas. En este caso, la función diterpénica podría estar jugando un rol similar al del  $\beta$ -caroteno, cuya capacidad antioxidante en sistemas lipofílicos puede superar al  $\alpha$ -tocoferol (compuesto fenólico) (Niki y cols., 1995). Por tanto esta sería la explicación de la mayor actividad antilipoperoxidante de romero comparado con el extracto de matico. Asimismo, la función fenólica, debido a su polaridad podría proteger mejor los tioles (grupos también polares) que la función terpénica.

Resumiendo, podemos decir que los extractos de matico y romero fueron capaces de proteger los lípidos y los grupos tiólicos de las proteínas presentes en el homogeneizado de trucha arcoiris. La acción antioxidante de los extractos naturales dependería tanto de la estructura química como de la relación de los principios activos presentes en cada extracto. Nuestros resultados indican que el extracto hidroalcohólico de matico estaría enriquecido en polifenoles en cambio el extracto de romero estaría enriquecido en o-difenoles-diterpénicos de acuerdo a los antecedentes de la literatura. Por otra parte, nuestros resultados parecen indicar que los polifenoles serían mejores

protectores de proteínas y los o-difenoles-diterpénicos, de biomoléculas lipofílicas como por ejemplo los fosfolípidos de membrana. Este es un antecedente que vale la pena considerar y que requiere mayores estudios ya que dependiendo de la composición del alimento, se podrían preparar extractos enriquecidos en determinados principios antioxidantes que permitan aumentar la eficacia de los preparados naturales como preservantes de las propiedades organolépticas y por tanto también nutritivas de los alimentos.

Por otra parte, también es importante considerar los efectos sinérgicos antioxidantes inducidos por los distintos principios activos naturales, como también, los efectos benéficos para la salud humana, características que no son atribuibles a los antioxidantes sintéticos (Middleton y cols., 2000). Estos antecedentes justifican nuestro estudio que siendo preliminar, debería proyectarse para considerar como alternativa cierta el uso de preparados naturales como preservante de alimentos y así reemplazar a los sintéticos ya cuestionados por sus riesgos de toxicidad.



## Conclusiones

1. El BHT, el extracto hidroalcohólico de matico, y el extracto seco de romero fueron capaces de inhibir la lipoperoxidación de homogeneizado de filetes de trucha arcoiris inducida por el sistema  $Fe^{3+}$ /ascorbato de una forma concentración-repuesta.
2. El BHT, el extracto hidroalcohólico de matico, y el extracto seco de romero fueron capaces de proteger parcialmente el contenido de tioles del homogeneizado de filetes de trucha arcoiris, disminuido por el sistema  $Fe^{3+}$ /ascorbato.
3. Los polifenoles presentes los extractos naturales serían los principales responsables de la protección de grupos tiólicos presentes en el homogeneizado de filetes de trucha arcoiris, mientras que los o-difenoles-diterpénicos serían los responsables principales de la actividad antilipoperoxidante.
4. Además de la estructura química de los principios activos presentes en los extractos naturales, es importante también considerar las propiedades físico-químicas de ellos, como es su polaridad.

## V. REFERENCIAS

1. Aikenss, J. y Dix, T. A. (1991). Perhydroxyl Radical (HOO•) Initiated Lipid Peroxidation. *J. Biol. Chem.* **266(23)**: 15091-15098.
2. Andia, A. M. y Street, J. C. (1975). Dietary induction of hepatic microsomal enzymes by thermally oxidize fats. *J. Agric. Food Chem.* **23(2)**: 173-177.
3. Bruneton, J. (2001). *Farmacognosia fitoquímica y plantas medicinales: Fenoles, ácidos fenólicos*. Ed. Acribia S.A., 3° edición. Pág. 249-250.
4. Davies, M. J. (2004). Reactive species formed on proteins exposed to singlet oxygen. *Photochem. Photobiol. Sci.* **3(1)**: 17-25.
5. Dean, R. T., Fu, S., Stocker, R. y Davies, M. J. (1997). Biochemistry and pathology of radical-mediated protein oxidation. *Biochem. J.* **324(1)**: 1-18.
6. García-Pineros, A., Castro, V., Mora G., Schnidt, T., Strunck, E., Pahl, H. y Merfort, I. (2001). Cysteine 38 in p65/ NF- $\kappa$ B plays a crucial role in DNA binding inhibition by sesquiterpene lactones. *J. Biol. Chem.* 2001 **276(43)**: 39713-39720.
7. Greenwald, R. A. (1990). Current approaches to the development of oxygen radical scavengers. *Drugs of Today.* **26(5)**: 299-307.
8. Guay, D. F., Cole, B. J. W., Fort, R. C. Jr., Hausman, M. C., Genco, J. M. y Elder, T. J. (2002). Mechanisms of Oxidative Degradation of Carbohydrates during Oxygen Delignification. III. Reaction of Photochemically Generated Hydroxyl Radicals with 1,4-Anhydrocellobitol and Cellulose. *J. Pulp and Paper Sci.* **28(7)**: 217-221.
9. Hall, C. A., Cuppett, S. L., Dussault, P. (1998). Hydrogen-Donating Mechanism of Rosmariquinone, an Antioxidant Found in Rosemary. *JAOCS.* **75**, 1147-1154.

10. Hanne, H., Refsgaard, H., Tsai, L. y Stadtman E. R. (2000). Modifications of proteins by polyunsaturated fatty acid peroxidation products. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **97(2)**: 611-6.
11. Horie, T., Awazu, S., Itakura, Y. y Fuwa, T. (1992). Identified diallyl polysulfides from an aged garlic extract which protects the membranes from lipid peroxidation [letter]. *Planta Med.* **58**: 468-469.
12. Jiménez, I., Gotteland, M., Zarzuelo, A., Uauy, R. y Speisky, H. (1997). Loss of the metal binding properties of metallothionein induced by hydrogen peroxide and free radicals. *Toxicology.* **120**: 37-46.
13. Letelier, M. E., Izquierdo, P., Godoy, L., Lepe A. M., Faúndez, M. (2004) Liver microsomal biotransformation of nitro-aryl drugs: A mechanism for potential oxidative stress induction. *J. Appl. Toxicol.*, **24(6)**: 519-525.
14. Liao, Y., Houghton, P. J., y Houtt, J. R. S. (1999). Novel and known constituents from *Buddleja* species and their activity against leukocyte eicosanoid generation. *J. Nat. Prod.* **62(9)**: 1241-1245.
15. Loro, J. F., Del Río, I. y Perez-Santana, L. (1999). Preliminary studies of analgesic and anti-inflammatory properties of *Opuntia dillenii* aqueous extract. *J. Ethno Pharmacol.* **67(2)**: 213-218.
16. Lowry, O. H., Rosenbrough, N. J., Farr, A. L. y Randall, R. J. (1951). Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* **193**: 265-273.
17. Marnett, L. J. (2000). Oxiradicals and DNA damage. *Carcinogenesis.* **21(3)**: 361-371.
18. Masson, L., Robert, P., Flores, M., Fredes, C., Morend, L., Verdugo, G. (2005). Evaluación de un extracto de romero orgánico (*Rosmarinus officinalis*) producido

en Chile como antioxidante natural aplicado en bases grasas animales y vegetales. Proyecto FIA - C- 001-A-071. Anales para la Innovación Agraria (FIA).

19. Meera, P., Khan, N. y Parthasarathy, S. (2000). Dietary oxidized fatty acids: an atherogenic risk?. *J. Lipid Res.* **41(9)**: 1473-1480.
20. Middleton, E., Kandaswami, C. y Theoharides, T. (2000). The effects of plants flavonoids on mammalian cells: implications for inflammation, heart disease, and cancer. *Pharmacological Reviews* **52**: 673-751.
21. Min, D. B. y Boff, J. M. (2002). Chemistry and Reaction of Singlet Oxygen in Foods. *Comp. Rev. Food Sci. Food Saf.* **1**: 58-72.
22. Moller, I. M. y Kristensen, B. K. (2004). Protein oxidation in plant mitochondria as a stress indicator. *Photochem. Photobiol. Sci.* **3(8)**: 730-735.
23. Morin, B., Davies, M. J., y Dean, R. T. (1998). The protein oxidation product 3,4-dihydroxyphenylalanine (DOPA) mediates oxidative DNA damage. *Biochem. J.* **15(330)**: 1059-1067.
24. Nakabeppu Y. (2001). Regulation of intracellular localization of human MTH1, OGG1, and MYH proteins for repair of oxidative DNA damage. *Prog. Nucleic Acid Res. Mol. Biol.* **68**: 75-94.
25. National Toxicology Program. (2002). BUTYLATED HYDROXYANISOLE (BHA). *Rep. Carcinog.* **10**: 40-42.
26. Neuzil, J., Gebicki, J. M. y Stocker, R. (1993). Radical-induced chain oxidation of proteins and its inhibition by chain-breaking antioxidants. *Biochem. J.* **293**: 601-606.
27. Niki, E., Noguchi, N., Tsuchihashi, H. y Gotoh, N. (1995) Interaction among vitamin C, vitamin E, and beta-carotene. *Am. J. Clin. Nutr.* **62**:1322-1326

28. Palamanda, J. y Kehrer, J. (1992). Inhibition of protein carbonyl formation and lipid peroxidation by glutathione in rat liver microsomes. Arch. Biochem. Biophysics. **293(1)**: 103-109.
29. Pardo, F., Perich, F., Villarroel, L., y Torres, R. (1993). Isolation of verbascoside, an antimicrobial constituent of *Buddleja globosa* leaves. J. Ethnopharmacol, **39**: 221-222.
30. Pardo, F., Perich, F., y Torres, R. (1997). Un nuevo glicósido de *Buddleja globosa* con actividad bactericida. Bol. Soc. Chil. Quim. **42(1)**: 101-104.
31. Pietta P. G. (2000). Flavonoids as antioxidants. J. Nat. Prod. **63(7)**:1035-1042.
32. Price, P.W.; Waring, G.L.; Julkunen-Tiitto, R.; Tahvanainen, J.; Mooney, H.A; Craig, T.P.(1989). Carbon-nutrient balance hypothesis in within species phytochemical variation of *Salix lasiolepis*. J. Chem. Ecol. **15**:1117-1131.
33. Psomiadou, E. y Tsimidou, M. (2002). Stability of Virgin Olive Oil. 2. Photo-oxidation Studies. J. Agric. Food Chem. **50**: 722-727.
34. Ravanat, J., Di Mascio, P., Martinez, G. R., Medeiros, M. H., y Cadet, J. (2000). Singlet Oxygen Induces Oxidation of Cellular DNA. J. Biol. Chem. **275(51)**: 40601-40604.
35. Reznick, A. y Packer, L. (1992). Oxidative Damage to Proteins: Spectrophotometric Method for Carbonyl Assay. Methods in Enzymology. **233**: 357-363.
36. Saito, M., Sakagami, H., Fujisawa, S. (2003). Cytotoxicity and apoptosis induction by butylated hydroxyanisole (BHA) and butylated hydroxytoluene (BHT). Anticancer Res. **23(6C)**: 4693-4701.

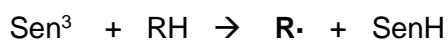
- 37.** Thornalley, P. J. y Vasak, M. (1985). Possible role for metallothionein in protection against radiation-induced oxidative stress. Kinetics and mechanism of its reaction with superoxide and hydroxyl radicals. *Biochim. Biophys. Acta.* **827**: 36-44.
- 38.** Vargas, L., Backhouse, N., Delporte, C., Erazo, S. y Negete, R. (2000). Evaluación de la actividad analgésica de *Buddleja globosa* Hope, Buddlejaceae, Matico. *Gayana Botánica* **57**: 9.
- 39.** Wolff, S. P., Garner, A. y Dean, R. T. (1986). Free radicals, lipids and protein degradation. *TIBS.* **11**: 27-31.

## Anexo I: Reacciones químicas mencionadas en esta tesis

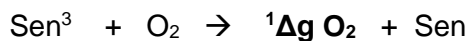
### MECANISMOS INICIADORES DE LA DEGRADACIÓN DE ALIMENTOS.

#### Iniciación Fotoquímica

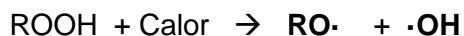
Radicalaria:



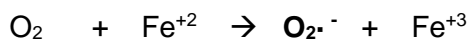
No Radicalaria:



#### Iniciación Térmica

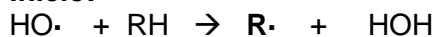


#### Iniciación Química

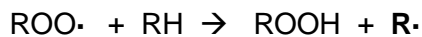
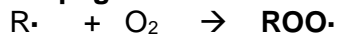


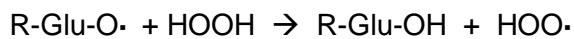
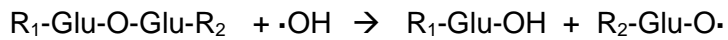
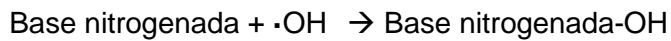
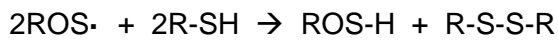
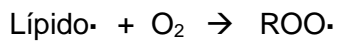
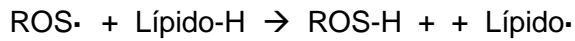
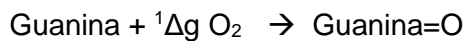
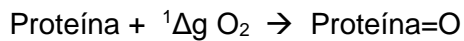
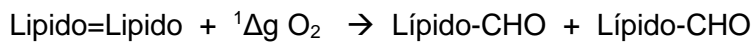
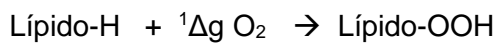
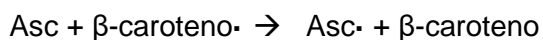
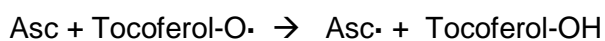
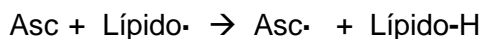
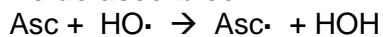
### MECANISMO GENERAL DE LAS REACCIONES RADICALARIAS.

**Inicio:**



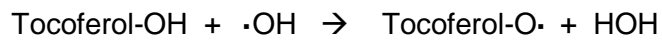
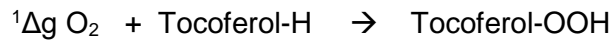
**Propagación:**



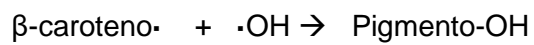
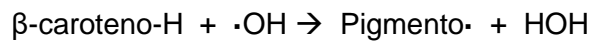
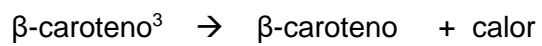
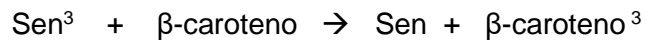
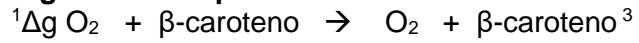
**Término:****OXIDACIONES RADICALARIAS:****FOTOOXIDACIONES:****MECANISMOS ANTIOXIDANTES****Acido ascórbico**



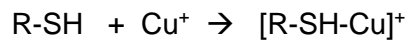
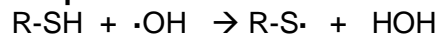
### **Tocoferoles**



### **Pigmentos Terpenoides**



### **Grupos -SH**



### **Grupos Fenólicos**

