



UNIVERSIDAD DE CHILE

FACULTAD DE CIENCIAS QUIMICAS Y FARMACEUTICAS

Departamento de Química Farmacológica y Toxicológica

Laboratorio de Productos Naturales

Evaluación comparativa de la actividad antioxidante y fenoles totales en diversos extractos de ecotipos de *Ugni molinae* Turcz.

YAIDELYN PIÑA GONZALEZ

Memoria para optar por el título de Químico Farmacéutico

Profesor Patrocinante:

Dra. Carla Delporte V.

Director de tesis:

Dra. Carla Delporte V.

SANTIAGO – CHILE

2011

A mis abuelos

Agradecimientos

En primer lugar quiero agradecer a Dios por su compañía, amor y consuelo en los momentos de duda y necesidad a lo largo de estos años.

A mi madre, que con su dedicación, amor, comprensión y sabiduría me ha guiado durante toda mi vida, para siempre luchar por mis sueños y realizar mis metas.

A mi padre, mi mejor amigo y compañero, por su amor, buen humor y dulzura. De él aprendí que los fracasos son enseñanzas y que no existen imposibles.

A mi hermana y hermanos que siempre me han apoyado y me han brindado su amor y compañía a pesar de la distancia.

A mis tíos, tías, primos y primas, somos una familia grande y separada por muchos kilómetros pero siempre su amor, cariño y alegría han estado en mi corazón, y sin importar donde estén ustedes vienen conmigo.

A mi madrina Valle, su amor incondicional ha estado conmigo siempre y mucho de lo que soy hoy y adonde he llegado y lo que me falta recorrer es gracias a ella.

A Nellis, que siempre me ha acompañado con un amor incondicional de madre, hermana y amiga, llenando mi vida de alegría y cariño, gracias a su apoyo y comprensión he logrado superar cada prueba por muy difícil que esta fuese.

A Leonela, mi ahijada, Samuel y Andrés, mis sobrinos, su amor y cariño son el motor que me impulsa a seguir adelante.

A mis amigas y amigos de Venezuela, en especial a Yessica y Carolina, gracias por su apoyo, comprensión y cariño y por tantos momentos compartidos.

A mis amigas y amigos de Chile, en especial a Francesca y Valentina, gracias por siempre estar ahí con una sonrisa y un abrazo, en las buenas y en las malas.

A Mario Rodríguez, gracias a tu amor y apoyo he seguido adelante a pesar de todo y sin importar que tan alta sea la montaña.

A la Dra. María Victoria García y a la Dra. Karina González, por su dedicación y entrega a la carrera de Farmacia, sembraron en mi la semilla de la investigación.

A la Dra. Carla Delporte, que desde el primer momento me ha apoyado, y con paciencia y cariño me ha guiado durante estos años, ha aprender de los errores y a crecer como mejor ser humano.

A las profesoras Olosmira Correa y Edda Costa, por su comprensión y apoyo en este proceso.

A Gabriela, Consuelo, Jessica, León y Carlos, por sus valiosos consejos y por su compañerismo.

A todo el equipo del Laboratorio de Productos Naturales, en especial a: Cristian, Daniela, Cote, Magdalena, Marcelo, Pablo, Pamela y Patricio, por su cariño, amistad y compañerismo.

Al Sr. David Aravena, por la ayuda y soporte brindado en estos años de trabajo, acompañado de un gran cariño y respeto.

Por último quiero agradecer a todos los docentes que han ayudado en mi formación universitaria desde la Universidad Central de Venezuela hasta la Universidad de Chile, gracias por ayudarme a construir el amor, cariño y respeto que siento por esta carrera.

ESTA MEMORIA FUE FINANCIADA POR

Proyecto FONDECYT: N° 1100750

Investigador responsable: Carla Delporte Vergara

TABLA DE CONTENIDOS

TABLA DE CONTENIDOS.....	i
TABLA DE ABREVIATURAS	iii
ÍNDICE DE TABLAS.....	iv
ÍNDICE DE FIGURAS.....	vii
RESUMEN	vii
SUMMARY.....	viii
I. INTRODUCCIÓN.....	1
1. Ficha botánica de la especie <i>Ugni molinae</i> Turcz.....	4
1.1. Clasificación taxonómica.....	4
1.2. Distribución geográfica.....	5
1.3. Condiciones de desarrollo	5
2. Estudios anteriores de <i>Ugni molinae</i>	6
2.1. Composición química de las hojas.....	6
2.2. Actividad antioxidante de infusos de <i>Ugni molinae</i>	9
2.3. Resultados de la actividad protectora sobre daño oxidativo en eritrocitos.....	9
II. HIPÓTESIS.....	11
III. OBJETIVOS.....	12
1. Objetivos generales.....	12
2. Objetivos específicos.....	12
IV. MATERIALES Y MÉTODOS.....	13
1. Material vegetal.....	13
2. Estudios químicos.....	14
2.1. Obtención de extractos seriados de <i>U. molinae</i>	14

2.2. Determinación de la cantidad de fenoles totales mediante la reacción de Folin-Ciocalteu.....	15
3. Estudios farmacológicos.....	16
3.1. Ensayo de inhibición de la enzima xantina oxidasa.....	16
3.2. Atrapamiento del anión superóxido.....	18
3.3. Cinética de atrapamiento del radical DPPH.....	21
V. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	24
1. Estudios químicos.....	24
1.1. Extracción.....	24
1.2. Determinación de la cantidad de fenoles totales mediante la reacción de Folin-Ciocalteu de los extractos de <i>U. molinae</i>	25
2. Estudios farmacológicos.....	29
2.1. Ensayo de xantina-oxidasa.....	29
2.2. Atrapamiento de anión superóxido.....	32
2.3. Cinética de atrapamiento del radical DPPH.....	32
VI. CONCLUSIONES.....	42
VI. REFERENCIAS.....	45
ANEXOS	49

TABLA DE ABREVIATURAS

ac	Ácido
CE ₅₀	Concentración inhibitoria 50
CONC	Concentración
DCM	Diclorometano
DPPH	Radical 2,2 difenil-1-picril hidrazilo
DPPHrem	DPPH remanente
EA	Eficiencia antioxidante
EAE	Extracto de acetato de etilo de hojas de <i>U. molinae</i>
EDCM	Extracto de diclorometano de hojas de <i>U. molinae</i>
E1	Ecotipo 1
E2	Ecotipo 2
E3	Ecotipo 3
E4	Ecotipo 4
E5	Ecotipo 5
E-Cau	Ecotipo Cauquenes
E-Chi	Ecotipo Chiloé
EET	Extracto etanólico de hojas de <i>U. molinae</i>
EHEX	Extracto hexánico de hojas de <i>U. molinae</i>
EtOAc	Acetato de etilo
EtOH	Etanol
es	extracto seco
g	gramos
Log	Logaritmo base 10
mg	miligramos
ppm	partes por millón
SD	Desviación estándar
SEM	Error estándar de la media
TCE ₅₀	Tiempo concentración efectiva cincuenta
UA	Unidades de absorbancia
SO	Anión superóxido
SOD	Superóxido dismutasa

XO

$\mu\text{g}/\text{mL}$

$\mu\text{M}/\text{mL}$

Xantino Oxidasa

Microgramo por mililitro

Micro molar por mililitro

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1: Datos de recolección de ejemplares de <i>Ugni molinae</i>	13
Tabla 2: Tabla resumen del protocolo de la determinación de fenoles totales mediante la reacción de Folin-Ciocalteu	16
Tabla 3: Tabla resumen del protocolo del ensayo de inhibición de xantino oxidasa...15	
Tabla 4: Tabla resumen del protocolo del ensayo de atrapamiento del SO.....	15
Tabla 5: Rendimiento del proceso de extracción de las hojas de <i>Ugni molinae</i> de los distintos ecotipos en estudio.....	24
Tabla 6: Contenido de fenoles totales de los distintos ecotipos de <i>U. molinae</i> EAE...27	
Tabla 7: Contenido de fenoles totales de los distintos ecotipos de <i>U. molinae</i> EET...28	
Tabla 8: Concentración efectiva 50 de los distintos ecotipos de <i>U. molinae</i> EET.....30	
Tabla 9: Concentración efectiva 50 de los distintos ecotipos de <i>U. molinae</i> EET.....33	
Tabla 10: Concentración efectiva 50 de los distintos ecotipos de <i>U. molinae</i> EET y los patrones evaluado.....	36
Tabla 11: CE ₅₀ , TCE ₅₀ y EA de los distintos ecotipos de <i>U. molinae</i> EET y los patrones evaluados.....	37
Tabla 12: Resumen de los resultados obtenidos para los distintos ecotipos de <i>U. molinae</i> EET.....	41

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1: Clasificación taxonómica de <i>U. molinae</i>	4
Figura 2: Fotos de <i>U. molinae</i>	6
Figura 3: Compuestos fenólicos identificados en extractos de hojas de murta.....	7
Figura 4: Ácidos triterpenos pentacíclicos identificados en EDCM y EAE de hojas de murta.....	8
Figura 5: Proceso de extracción de hojas de <i>U. molinae</i>	14
Figura 6: Gráfico comparativo de los rendimientos de extracción de las hojas de los distintos ecotipos de <i>U. molinae</i>	25
Figura 7: Curva de calibración de ácido gálico para la determinación de fenoles totales por el método de Folin-Ciocalteu.....	26
Figura 8: Contenido de fenoles totales expresados en mg ácido gálico/g extracto seco para los extractos EAE de los distintos ecotipos de <i>U. molinae</i>	27
Figura 9: Contenido de fenoles totales expresados en mg ácido gálico/g extracto seco para los extractos EET de los distintos ecotipos de <i>U. molinae</i>	28
Figura 10: % Inhibición xantino oxidasa vs. concentración (ppm) para el EET del E-Cau.....	29
Figura 11: Log% Inhibición xantino oxidasa vs. Log concentración (ppm) para el EET del E-Cau.....	30
Figura 12: % atrapamiento del anión superóxido vs. concentración (ppm) para el EET del E2.....	32
Figura 13: % atrapamiento del anión superóxido vs. Log concentración (ppm) para el EET del E2	33
Figura 14: Cinética de atrapamiento del radical DPPH, para el EET del E-Chi.....	35
Figura 15: %DPPHrem vs. concentración (pmm), para el EET del E-Chi extracto etanólico.....	36
Figura 16: Cinética de atrapamiento del radical DPPH, para las CE ₅₀ de los ecotipos evaluados de <i>U. molinae</i>	37
Figura 17: Estructuras químicas correspondientes al ácido gálico y al sesamol.....	38
Figura 18: Contenido de fenoles totales vs. % inhibición del radical DPPH (5ppm) para 7 ecotipos evaluados de <i>U. molinae</i>	39

RESUMEN

Evaluación comparativa de la actividad antioxidante y fenoles totales en diversos extractos de ecotipos de *Ugni molinae* Turcz.

La murtila o murta (*Ugni molinae* Turcz., Myrtaceae) es nativa del centro y sur de Chile y en Argentina. Se cultiva por sus frutos, de agradable sabor y aroma, la infusión de las hojas es usada en medicina tradicional para suavizar el cutis reseco y aumentar la elasticidad y frente a inflamaciones y dolor. En este trabajo se realizó un estudio comparativo entre los extractos provenientes de diferentes ecotipos de *Ugni molinae* para determinar su contenido en fenoles y la actividad antioxidante.

Los extractos fueron obtenidos de cada ecotipo agotando en forma secuencial las hojas con solventes de polaridad creciente, se evaluaron los extractos con una mayor concentración en fenoles, mediante el ensayo de Folin-Ciocalteu, resultando el ecotipo de Queule el que presentó mayor contenido en su extracto etanólico (EET) ($462,4 \pm 0,2$ mg ác. gálico/g es). Posteriormente se evaluó la actividad antioxidante en los EET, se realizó el ensayo de xantino oxidasa, en este caso fue uno de los ecotipos de Porma (E3) el que presentó mayor potencia frente a la enzima con una CE_{50} $1,9 \pm 0,01$ ppm, el segundo ensayo realizado fue el de atrapamiento del SO, en éste el ecotipo de Mehuin (E4) el que presentó una mayor capacidad de atrapar el SO con una CE_{50} $0,50 \pm 0,01$ ppm, el último ensayo realizado fue el de cinética de atrapamiento del radical DPPH, en este caso fue el ecotipo de Cauquenes el que presentó una mayor potencia seguido de una alta eficiencia antioxidante.

Las diferencias observadas entre los distintos ecotipos, en relación a la actividad antioxidante, se puede suponer que se deban al conjunto de taninos y flavonoides presentes en sus EET.

Estos resultados permiten establecer que las variaciones en la ubicación geográfica de los ecotipos afecta su actividad antioxidante, y abre la puerta a otros estudios químicos y farmacológicos más detallados de la especie que permitan establecer su composición química en polifenoles, para poder potenciar a los extractos de murtila como fuente de antioxidantes en busca de futuros fitofármacos.

SUMMARY

Comparative evaluation of the antioxidant activity and total phenols in multiple extracts of ecotypes of the *Ugni molinae* Turcz.

The murtila or murta (*Ugni molinae* Turcz., Myrtaceae) is native of the center and south of Chile and Argentina. It is harvest for its fruits of pleasant flavor and scent, the infusion of the murtila leaves it is used in traditional medicine to soften dry skin and to give more elasticity, besides it is used in front of inflammation and pain. On this work a comparative study was made between extracts from different ecotypes of the *Ugni molinae* to determine their content in phenols and the antioxidant activity.

The extracts gotten from each ecotype exhausting in sequential way the leaves of hexane, dichloromethane, ethyl acetate and ethanol, the extracts evaluated we found a great concentration of phenols, therefore the Folin-Ciocalteu test was made, being that Queule ecotype presented a greater content of total phenols ($462,4 \pm 0,2$ mg gallic acid/g dried extract). Later the antioxidant activity was evaluated in the ethanol extracts (EET), in first place the xanthine oxidase test was made, in this case one of the ecotypes from Porma (E3) presented a greater potential in front of the enzyme with a $CE_{50} 1,9 \pm 0,01$ ppm, the second test was the catching of the SO, in this test was the Mehuin ecotype (E4) the one that presented a greater capacity to catch the SO with a $CE_{50} 0,50 \pm 0,01$ ppm, the last test was the kinetic catching of the radical DPPH, in this case was the Cauquene ecotype the one that had a greater potential followed by a high antioxidant efficiency.

The differences observed in the different ecotypes, in relation to the antioxidant activity it can be presume that the set of tannins and flavonoids presented in the EET. These results allow establishing what variations in the location of the ecotypes affect its antioxidant activity, and open the door to more deeply chemical and pharmacological studies of the species that allows a chemical composition of polyphenols to be able maximize the murtila extracts as a source of antioxidants in the search of future herbal medicines.

I. INTRODUCCIÓN

Desde el inicio de la historia, el ser humano ha estudiado la naturaleza descubriendo las propiedades curativas y preventivas de diversas especies así como las propiedades tóxicas de otras, construyendo un legado milenario de conocimientos en medicina tradicional, que se ha pasado a través de las generaciones. Parte de ese legado se encuentra en Chile que posee una amplia gama de especies con diversas propiedades curativas, conocimientos que se han pasado a través de los años por sus pueblos originarios.

Dentro de ese legado se encuentra la murta o murtila (*Ugni molinae* Turcz.), la murtila es un arbusto de la familia de las Myrtaceae nativa del centro y sur de Chile y de zonas aledañas en Argentina. En Chile crece en bosques litorales y montañas costeras de la VII a la X Región, especialmente en la Cordillera de la Costa y parte de la Pre-cordillera Andina. Posee una amplia distribución encontrándose desde la Región de O'Higgins hasta la Región de Aysén (Seguel et al., 1999).

La murtila, se cultiva por sus frutos, de agradable sabor y aroma. El período de recolección de los frutos depende de la zona, y es más tardío cuanto más fría sea la región de cultivo. El fruto se utiliza en repostería y en la fabricación de mermeladas, jugos y chocolates, así como para la elaboración de licores. Además, la infusión de las hojas de murtila es usada en medicina tradicional para suavizar el cutis reseco y aumentar la elasticidad y frente a inflamaciones y dolor. Estudios realizados recientemente han demostrado que los frutos poseen flavonoles, flavan-3-oles y en general poseen un contenido en polifenoles alrededor de los 32 ± 4 mg ácido gálico/100g (Ruiz et al., 2010).

Además, los extractos de las hojas de murtila presentan compuestos polifenólicos como heterósidos de los flavonoles de miricetina, canferol y quercetina, presentes en extractos acuosos y alcohólicos, además de epicatequina y derivados de ácido gálico en extractos alcohólicos y acuosos respectivamente (Rubilar et al., 2006).

En extractos de DCM y EtOAc se han encontrado triterpenos como el ácido asiático y el ácido alfitólico, que han demostrado tener efecto antiinflamatorio tópico (Aguirre et al., 2006; Delporte et al., 2007), debido a esto el interés por estudiar y conocer en mayor profundidad las bondades de esta especie, ha aumentado en los últimos años.

Existe suficiente evidencia científica que demuestra que una dieta rica en antioxidantes, disminuye la incidencia de enfermedades cardiovasculares y degenerativas como cáncer y aterosclerosis, enfermedades desencadenadas entre otras causas por estrés oxidativo en el organismo, daño que puede ser evitado o disminuido al aumentar la ingesta de antioxidantes. El estrés oxidativo se produce por un desbalance entre la producción de radicales libres y la concentración de antioxidantes presentes en el organismo (Pietta, 1999).

Entre los diferentes mecanismos enzimáticos involucrados, se encuentra la enzima xantina oxidasa (XO), responsable de ocasionar la gota y de producir daño oxidativo en tejidos. Esta enzima cataliza la oxidación de hipoxantina a xantina y de ésta a ácido úrico, estas reacciones llevan a la producción de anión superóxido (SO), aumentando los niveles de oxidación en el organismo. Se ha estudiado que inhibidores de la XO son potenciales agentes terapéuticos en contra de la hiperuricemia que termina ocasionando la gota, cálculos renales y enfermedades relacionadas con especies oxidativas del oxígeno (ROS) como aterosclerosis entre otras (Lin et al., 2002).

Esto potencia el interés de estudiar especies que aporten un alto contenido de antioxidantes como flavonoides y taninos como es el caso de la murta. Entre los efectos positivos que poseen los flavonoides destacan su actividad antioxidante, antiviral, anticancerígenos (Middleton, 1998), antiinflamatoria (Hayek, 1997), antialérgica (Middleton, 1998), anti-aterogénica (Hayek, 1997), y anti-trombosis (Baeuerle et al., 1998). Los flavonoides contribuyen a disminuir el estrés oxidativo al inhibir la activación de enzimas claves como la XO (Matsurama et al., 1998).

Como se describió anteriormente los extractos de murtila poseen en su composición taninos y flavonoides, en base a esto y debido a la amplia distribución geográfica de la murtila, es importante a su vez estudiar como las diferentes condiciones de suelo y clima pueden afectar el contenido de antioxidantes que aporta la planta y a su vez el efecto de estas condiciones a la capacidad antioxidante de los extractos obtenidos a partir del material vegetal.

El objetivo de este trabajo fue realizar un estudio comparativo entre los extractos provenientes de diferentes ecotipos de *Ugni molinae* para determinar su contenido en fenoles y la actividad atrapadora de radicales libres. Para esto se preparó extractos de cada ecotipo agotando en forma secuencial las hojas con hexano, diclorometano, acetato de etilo y etanol, se evaluaron los extractos en los cuales encontramos una mayor concentración en fenoles. Con este fin se realizó el ensayo de Folin-Ciocalteu para determinar el contenido de polifenoles totales, posteriormente se evaluó la actividad atrapadora de radicales libres de los extractos por medio de los ensayos de DPPH y SO. Se evaluó además la capacidad inhibitoria de la XO de todos los extractos obtenidos.

1. Ficha botánica de *Ugni molinae* Turcz.

1.1. Clasificación taxonómica

Nombre científico	• <i>Ugni molinae</i> Turcz.
Sinonimias	• <i>Myrtus ugni</i> Mol. • <i>Eugenia ugni</i> Hook. et Arn
Nombres vulgares	• murtila, murta, uñi o ünü (voz mapuche), Chilean guava (inglés), Chilean cranberry (inglés)
Familia	• Myrtaceae
Orden	• Myrtales
Clase	• Magnoliopsida
División	• Magnoliophyta

Figura 1: Clasificación taxonómica de *U. molinae*

(Reiche, 1998; Montenegro, 2000; Wilhelm de Mösbach, 1999)

1.2. Distribución geográfica

La *U. molinae* crece habitualmente en terrenos despejados, en bordes de bosques, formando parte del matorral, desde Talca (VII Región) hasta el río Palena (X Región). En la parte norte de su área de dispersión habita principalmente en la cordillera de la costa formando parte del bosque maulino. Más hacia el sur y hacia el interior del territorio forma parte de la densa formación arbustiva que crece a orillas de los bosques (Hoffmann, 1982; Montenegro, 2000).

1.3. Condiciones de desarrollo

En su hábitat natural, la murta se desarrolla como un arbusto, cuya altura varía entre 1 y 2 m, aunque puede alcanzar los 4 m. Es de hoja perenne, lanceolada, de color verde oscuro; su copa es densa y apretada. Las flores, hermafroditas, son de forma acampanada, de color blanco, rosado o purpúreo (Montenegro, 2000). La floración se produce a partir de finales de noviembre, el fruto madura hacia mediados del verano; es una baya globosa, de color rojo intenso y entre 5 y 15 mm de diámetro (Novoa, 1983) **(Figura 2)**.

La murta requiere suelos sin exceso de humedad y sol constante. Se adapta a la mayoría de los suelos, y es resistente a las sequías y a los vientos. Estudios recientes han catalogado a la murta como una especie tipo que requiere una baja exposición a la radiación UV ya que de esta forma logra desarrollarse satisfactoriamente, lo que a su vez la potencia como una especie de fácil domesticación y que permitiría desarrollar su cultivo a mayor escala, generando así atractivo económico en su desarrollo para la exportación de productos derivados de ella (Pastenes et al., 2002).

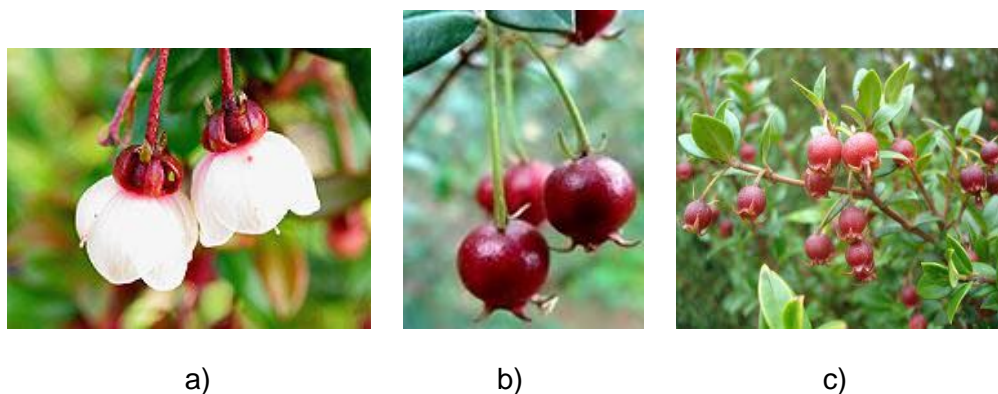


Figura 2: Fotos de *U. molinae*: a) flores de murta: hermafroditas de forma acampanada, de color rosado; b) frutos de murta: baya globosa de color rojo intenso; c) hojas de murta: de forma perenne, lanceolada y de color verde oscuro.

2. Estudios anteriores de *Ugni molinae*

2.1. Composición química de las hojas

Análisis químicos realizados en nuestro laboratorio confirman la presencia de compuestos polifenólicos y triterpenos en las hojas de murta (Aguirre et al., 2006; Delporte et al., 2007). Además los estudios farmacológicos realizados hasta ahora y los que están actualmente en curso, han permitido encontrar una relación entre la capacidad antioxidante de los extractos con su concentración de compuestos fenólicos. Recientemente se han desarrollado estudios que permitirán establecer la composición química de esta especie, con el objetivo de determinar que componentes son los responsables de su actividad antioxidante.

Así para la hoja se han descrito polifenoles como: epicatequina, diramnósido de miricetina, ramnósido de miricetina, glucósido de miricetina, diramnósido de quercetina, ramnósido de quercetina, glucósido de quercetina y el glucósido de canferol (Rubilar et al., 2006). Las estructuras se presentan a continuación:

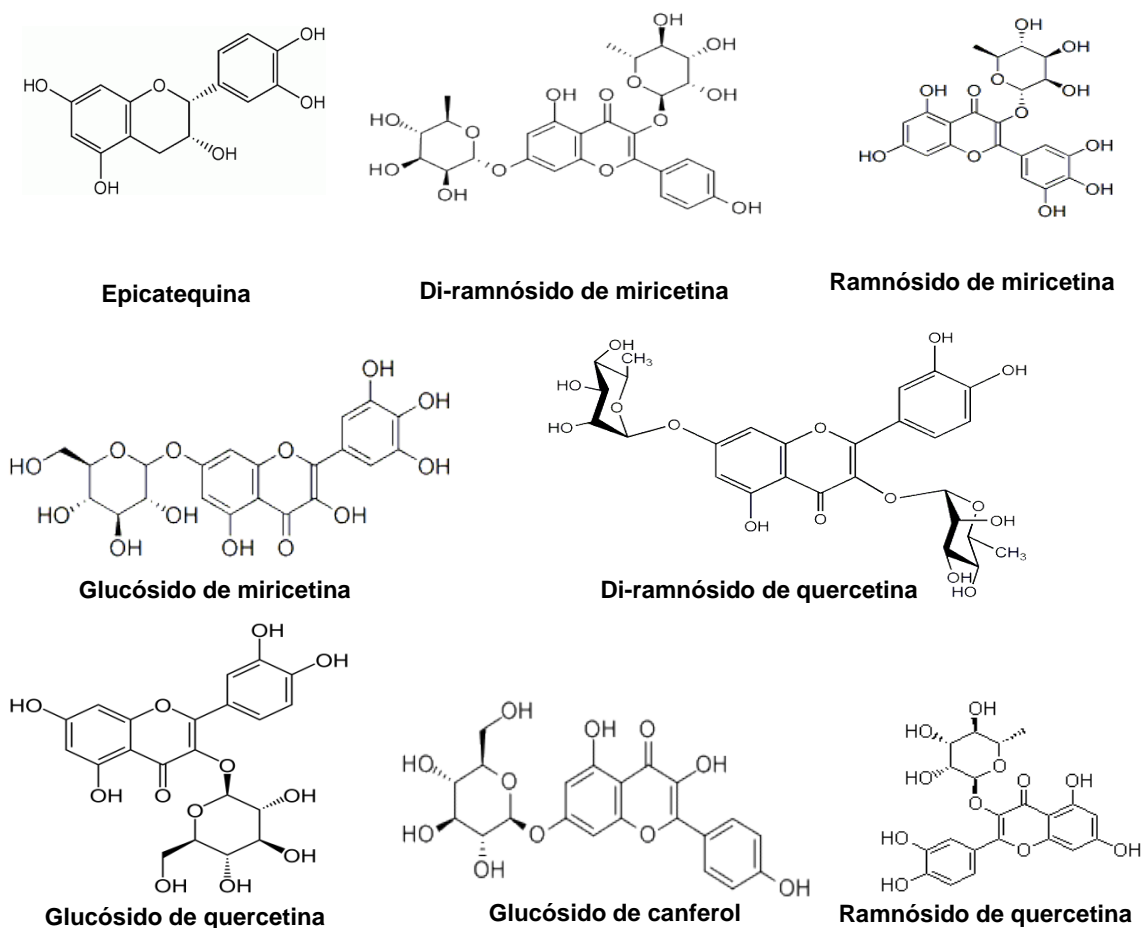
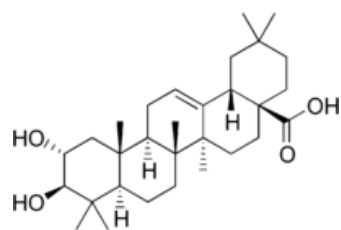
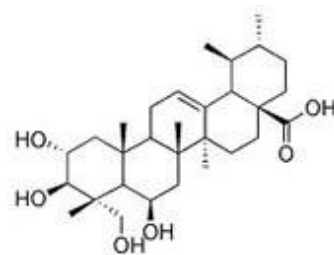


Figura 3: Compuestos fenólicos identificados en extractos etanólicos de hojas de murta

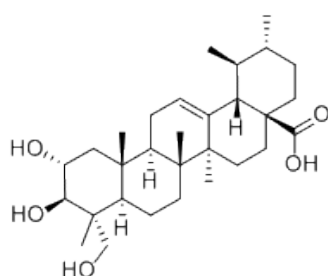
En los EDCM y EAE de las hojas de *U. molinae* se han encontrado triterpenos pentacíclicos, que han demostrado tener actividad antiinflamatoria tópica (Aguire et al., 2006; Delporte et al., 2007), las estructuras de los triterpenos encontrados hasta ahora se presentan a continuación:



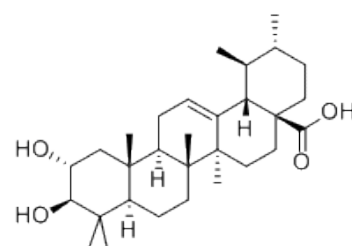
Ácido maslínico



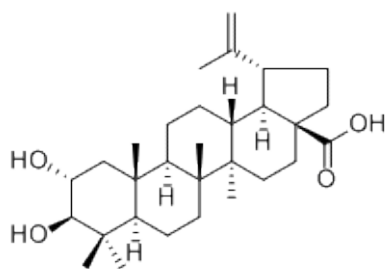
Ácido madecásico



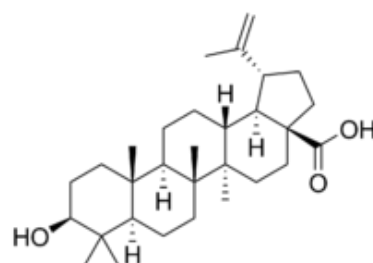
Ácido asiático



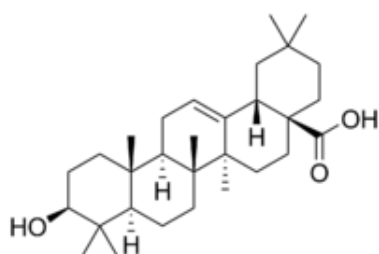
Ácido corosólico



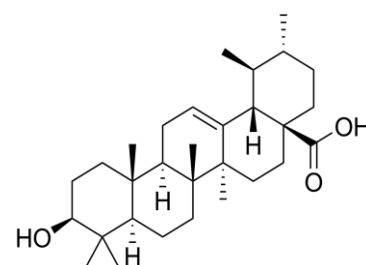
Ácido alfitólico



Ácido betulínico



Ácido oleanólico



Ácido ursólico

Figura 4: Ácidos triterpenos pentacíclicos identificados en EDCM y EAE de hojas de murta

2.2. Actividad antioxidante de infusos de *Ugni molinae*

Es ampliamente conocido que las sustancias antioxidantes son la principal defensa orgánica en contra de radicales libres, que como se comentó anteriormente dichos radicales en exceso aumentan el estado oxidativo del organismo lo que desencadena una serie de reacciones perjudiciales provocando estados patológicos severos (Pietta, 1999).

En la búsqueda de antioxidantes naturales, se ha demostrado que los infusos de murtila al 1% han demostrado tener actividad antioxidante por el método ORAC en plasma humano, este efecto se asocia a su contenido en polifenoles previamente descrito (Avello y Pastene, 2004; Rubilar et al., 2006).

2.3. Resultados de la actividad protectora sobre daño oxidativo en eritrocitos

Los antecedentes disponibles señalan que la peroxidación de lípidos en las membranas celulares interrumpe sus funciones protectoras y estructurales, como consecuencia varios eventos patológicos están implicados como resultados de esta oxidación (Abuja y Albertini, 2001), los mecanismos moleculares de la actividad antioxidante de los polifenoles, no se conocen con exactitud, pero uno de los mecanismos más aceptados está en la capacidad de estos compuestos de insertarse en las membranas celulares y modificar la estructura y fluidez de los lípidos de membranas (Arora et al., 2000; Nakagawa et al., 2000).

Como se mencionó anteriormente los extractos EAT, EET y acuosos poseen en su composición diversos polifenoles, además recientemente se ha demostrado que bajas concentraciones de los extractos acuosos de *U. molinae* muestran un efecto protector ante el daño ocasionado por estrés oxidativo producido por HClO y protección contra la hemólisis (Suwalsky et al., 2006).

Cabe destacar que los extractos acuosos de *U. molinae* inducen una alteración en la morfología celular de los eritrocitos humanos de su forma normal discoide a una forma equinocítica, induciendo una perturbación en la membrana fosfolipídica del eritrocito, aumentando su fluidez, por lo que la toxicidad de los extractos debe ser considerada ante un posible uso terapéutico (Suwalsky et al., 2006).

II. HIPÓTESIS

Los extractos obtenidos desde las hojas de los distintos ecotipos de murtila presentan distinta capacidad de actividad antioxidante debido a que su composición en polifenoles varía de acuerdo con el hábitat del cuál provienen.

III. OBJETIVOS

1. Objetivos generales

- ✓ Determinar la actividad antioxidante de los extractos obtenidos desde las hojas de diferentes ecotipos de *U. molinae*.
- ✓ Determinar la concentración de polifenoles totales en extractos obtenidos desde las hojas de diferentes ecotipos de *U. molinae*.

2. Objetivos específicos

- ✓ Obtener los diferentes extractos de cada ecotipo de *U. molinae* por agotamiento de las hojas con solventes de polaridad creciente.
- ✓ Implementar la metodología Folin-Ciocalteu, para la determinación de la concentración de fenoles totales.
- ✓ Implementar la metodología de anión superóxido para la determinación de la capacidad atrapadora de anión superóxido en los extractos que presenten un mayor contenido en fenoles.
- ✓ Implementar la metodología de DPPH para la determinación de la capacidad atrapadora de radicales libres en los extractos que presenten un mayor contenido en fenoles.
- ✓ Implementar la metodología de xantino oxidasa, en todos los extractos obtenidos de los diferentes ecotipos, para determinar que extractos tienen la capacidad de inhibir la enzima.

IV. MATERIALES Y MÉTODOS

1. Material vegetal

Se recolectaron siete ecotipos de *Ugni molinae*, Myrtaceae provenientes de diferentes localidades (**Tabla 1**) de los cuales 5 corresponden a ecotipos (E1-E5) proporcionados por la Dra. Ivette Seguel del Instituto Nacional de Investigación Agropecuaria (INIA), uno corresponde a un ejemplar proveniente de la Provincia de Chiloé (E-Chi) y otro de la Provincia de Cauquenes (E-Cau).

Se guardó un testigo en el Herbario de la Escuela de Química y Farmacia, Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas de la Universidad de Chile para E-Chi y E-Cau, cuyos números de registro corresponden respectivamente a SQF-22463 y SQF-22462. Todos los ecotipos fueron recolectados en el mes de abril en el año 1996.

Tabla 1: Datos de recolección de ecotipos de *Ugni molinae*

	Localidad		Ubicación geográfica
E-Cau	Villa Alegre	Región del Maule	35° 41'S; 71° 40'O
E1	Puren	Región de la Araucanía	38° 03'S; 73° 10'O
E2	Porma	Región de la Araucanía	38° 08'S; 73° 16'O
E3	Porma	Región de la Araucanía	38° 09'S; 73° 17'O
E4	Mehuín	Región de los Ríos	39° 26'S; 73° 12'O
E5	Queule	Región de los Ríos	39° 23'S; 73° 12'O
E-Chi	Quemchi	Región de los Lagos	42° 01'S; 73° 30'O

2. Estudios químicos

2.1 Obtención de extractos seriados de *U. molinae*

Las hojas fueron secadas a 40 °C en estufa, hasta peso constante y molidas para ser sometidas a extracción sucesiva con solventes de polaridad creciente hasta total agotamiento del material vegetal, eliminando completamente el solvente por evaporación a presión reducida en un evaporador rotatorio. Para cada uno de los ecotipos, se obtuvieron los extractos secos de hexano (EHEX), diclorometano (EDCM), acetato de etilo (EAE) y etanol (EET) (**Figura 3**).

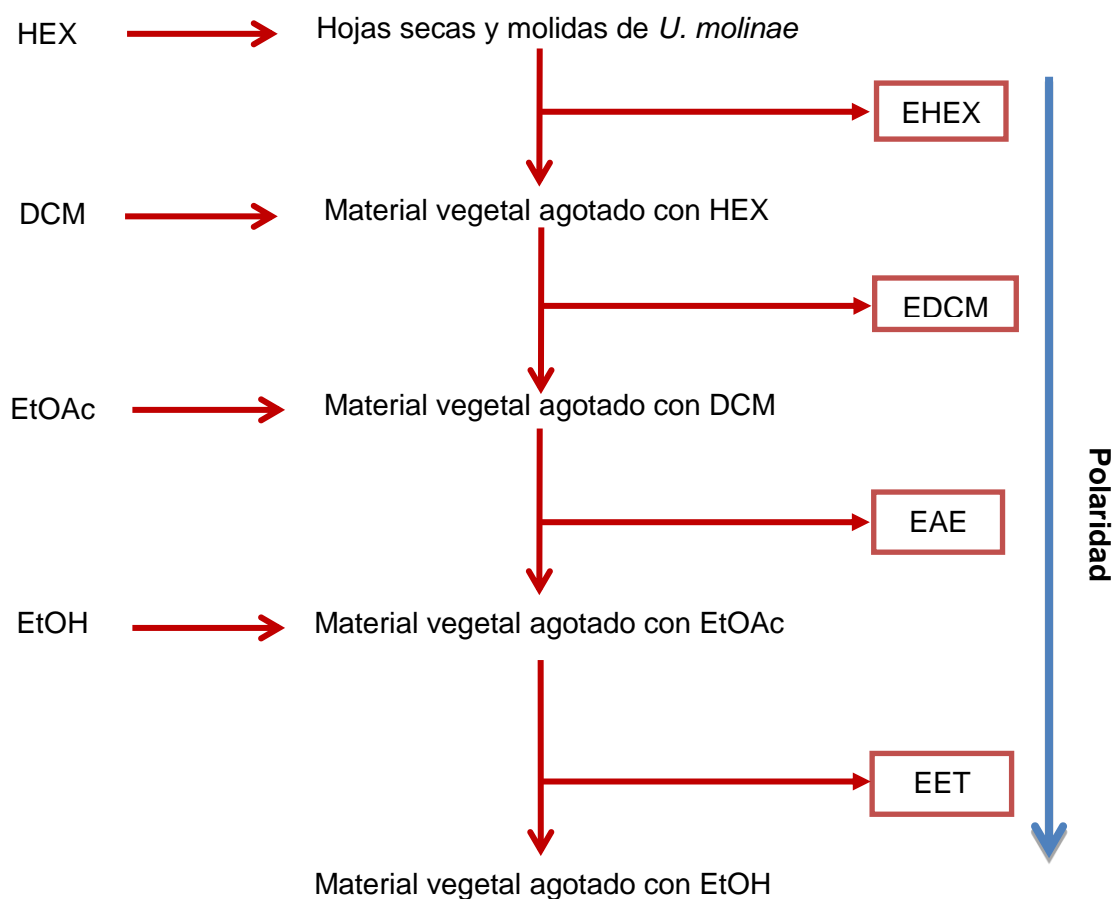


Figura 5: Proceso de extracción de hojas de *U. molinae*. EHEX: extracto hexánico; EDCM: extracto de diclorometano; EAE: extracto de acetato de etilo; EET: extracto etanólico

2.2. Determinación de la cantidad de fenoles totales mediante la reacción de Folin-Ciocalteu

Para la determinación de la cantidad de fenoles totales presente en los distintos extractos de los ecotipos de *U. molinae* se empleó el método de Folin-Ciocalteu, el cual se fundamenta en la reacción de óxido-reducción entre compuestos reductores y el reactivo de Folin-Ciocalteu (RFC) al producirse una transferencia alcalina de electrones reduciendo el complejo fosfomolibdico/fosfotúngstico a un cromógeno azul el cual es medido por colorimetría (Singleton y Rossi, 1965).

Para ello, 50 μ L de una solución de muestra en MeOH (80%) se homogeneizó en un vórtex con 450 μ L de agua destilada y se incorporó 2,5 mL de una solución de RFC (10%) se dejó por 5 min a 25 °C. Luego se agregó 2 mL de Na₂CO₃ (5%). Tanto esta solución como la solución blanco fueron homogeneizadas e incubadas en baño termostático a 30 °C por 90 min para posteriormente leer en espectrofotómetro a 765 nm, luego de enfriar por 5 min a temperatura ambiente.

El valor de fenoles totales en las muestras fue expresado en μ g/mL de ácido gálico para lo cual fue establecida una curva de calibración en un rango de 0 a 700 μ g/mL (Tawaha et al., 2007). El equipo utilizado para determinar la absorbancia fue un espectrofotómetro Unicam UV-VIS.

El contenido de fenoles totales se determinó por regresión lineal (n=3) mediante el análisis de las gráficas obtenidas utilizando el programa Graph Pad Prism versión 5.01. Los resultados se presentaron como mg ácido gálico/ g de extracto seco \pm SD. La significancia de los resultados fue determinada por el método ANOVA de una vía y análisis de comparaciones múltiples de Kruskal-Wallis para no paramétricos.

Tabla 2: Tabla resumen del protocolo de la determinación de fenoles totales mediante la reacción de Folin-Ciocalteu

	Análisis	Blanco
Solución de muestra en MeOH (80%)	50 µL	---
MeOH (80%)	---	50 µL
RFC (10%)	2,5 mL	2,5 mL
Agua destilada	450 µL	450 µL
<i>Homogeneizar. Incubar por 5 min a 25°C</i>		
Na ₂ CO ₃ (5%)	2 mL.	2 mL
<i>Homogeneizar e incubar a 30 °C por 90 min. Leer a 765 nm</i>		

RFC: reactivo de Folin-Ciocalteu

3. Estudios farmacológicos

Los estudios farmacológicos fueron realizados en los EET de los 7 ecotipos, por problemas de precipitación ocasionados por los medios acuosos de los estudios realizados.

3.1. Ensayo de inhibición de la enzima xantina oxidasa

La capacidad de inhibición de la enzima xantino oxidasa por los extractos etanólicos evaluados de murtilla fue medida espectroscópicamente siguiendo la formación de ácido úrico a 295nm con xantina como sustrato a 25°C. El equipo utilizado para determinar la absorbancia fue un espectrofotómetro Unicam UV-VIS.

3.1.1. Protocolo

El ensayo consistió en agregar directamente en la cubeta de cuarzo XO (10 mU/mL) en tampón fosfato pH 7,4 (10 mM) y la solución muestra (1-10 µg/mL), la reacción se inició al agregar X (40 µM/mL) y la tasa de formación de ácido úrico fue monitoreada espectrofotométricamente de manera continua por 30 min a 25 °C, la especificidad de la reacción se determinó utilizando un inhibidor específico de la xantina oxidasa en este caso se trabajó con alopurinol (1-100 µg/mL).

Tabla 3: Tabla resumen del protocolo del ensayo de inhibición de xantina oxidasa

	Blanco Enzima	Control negativo	Blanco muestra	Muestra
Buffer	600 µL	400 µL	600 µL	400 µL
XO	---	200 µL	----	200 µL
Agua Bidestilada	200 µL	200 µL	----	-----
Extracto	----	----	200 µL	200 µL
<i>Homogeneizar. Incubar a 25°C por 10 min</i>				
Xantina	200 µL	200 µL	200 µL	200 µL
Volumen final	1 mL	1 mL	1 mL	1 mL
<i>Homogeneizar. Leer a 290 nm por 30 min a 25°C</i>				

XO: xantina oxidasa

3.1.2. Tratamiento de datos

Se determinó el porcentaje de inhibición de la enzima por la siguiente fórmula:

Formula 1:

$$\% \text{Inhibición} = \frac{1 - (A_M - A_{BM})}{(A_{CN} - A_{BE})} \times 100$$

Dónde:

- A_{CN} = Absorbancia del control negativo
- A_{BE} = Absorbancia del blanco enzima
- A_M = Absorbancia muestra
- A_{BM} = Absorbancia del blanco muestra

Los datos se graficaron de la siguiente forma Log % inhibición vs. Log concentración (ppm), para poder determinar la CE_{50} , los ensayos fueron realizados con un $n=3$, utilizando el programa Graph Pad Prism versión 5.01. Los resultados se presentaron como $CE_{50} \pm SD$. La significancia de los resultados fue determinada por el método de Wilcoxon.

3.2. Atrapamiento del anión superóxido

En el proceso de catálisis de la oxidación de xantina (X) a ácido úrico por la enzima xantina oxidasa (XO) se produce la reducción de oxígeno generando el radical SO (McCord y Fridovich, 1968). Mediante esta reacción se evaluó la capacidad de las muestras de capturar el SO empleando la reacción de reducción de azul de nitrotetrazolio (NBT) a diformazán descrita por Aruoma *et al.* (1989), observándose a 560 nm una disminución de color con respecto al grupo control negativo.

3.2.1. Protocolo

La solución de reacción consistió en incorporar directamente en la cubeta de cuarzo: Na_2EDTA (100 μM), X (40 μM), NBT (40 μM) en tampón fosfato pH 7,4 (10 mM). La reacción se inició al agregar XO (10 mU/mL) y la tasa de decoloración fue monitoreada espectrofotométricamente de manera continua por 20 min a 25 °C en ausencia y presencia de las muestras a distintas concentraciones (1-10 $\mu g/mL$).

La especificidad de la reacción se determinó utilizando 100 mU/mL de superóxido dismutasa (SOD), en este caso la solución de reacción consistió en Na₂EDTA (100 µM), X (40 µM) y NBT (40 µM) en tampón fosfato pH 7,4 (10 mM). La reacción se inició al agregar XO (10 mU/mL), se homogeneizó y se pre-incubó por 10 min, posteriormente se incorporó SOD (100 mU/mL), se homogeneizó y se monitoreó por 20 min a 25 °C, la absorbancia de este control debe ser menor a la del control negativo.

Tabla 4: Tabla resumen del protocolo del ensayo de atrapamiento del anión superóxido

	Blanco Enzima	Control negativo	Blanco muestra	Muestra
Buffer	600 µL	500 µL	600 µL	600 µL
Xantina	100 µL	100 µL	100 µL	100 µL
EDTA	100 µL	100 µL	100 µL	100 µL
NBT	100 µL	100 µL	100 µL	100 µL
Agua Bidestilada	100 µL	100 µL	100 µL	-----
Extracto	----	----	100 µL	100 µL
<i>Homogeneizar. Incubar a 25°C por 10 min</i>				
XO	----	100 µL	----	100 µL
Volumen final	1 mL	1 mL	1 mL	1 mL
<i>Homogeneizar. Leer a 560 nm por 20 min cada 1 min a 25°C</i>				

XO: xantina oxidasa

3.2.2. Tratamiento de datos

Se determinó el porcentaje de atrapamiento del anión superóxido por la siguiente fórmula:

Formula 2:

$$\% \text{Atrapamiento} = \frac{(A_{CN} - A_{BE})}{(A_M - A_{BM})} \times 100$$

Dónde:

- A_{CN} = Absorbancia del control negativo
- A_{BE} = Absorbancia del blanco enzima
- A_M = Absorbancia muestra
- A_{BM} = Absorbancia del blanco muestra

Los datos se graficaron % atrapamiento vs. concentración (ppm), para poder determinar la dosis efectiva 50 (CE_{50}), los datos se trabajaron con un $n=3$, utilizando el programa Graph Pad Prism versión 5.01. Los resultados se presentaron como $CE_{50} \pm SD$. La significancia de los resultados fue determinada por el método de Wilcoxon.

3.3. Cinética de atrapamiento del radical DPPH

3.3.1 Protocolo

Para determinar la capacidad atrapadora del radical DPPH de los distintos extractos se preparó una solución metanólica de DPPH a 26 mg/mL, de la siguiente forma, se pesó 0,006 g de DPPH y se aforó a 250 mL con metanol P.A. y se protegió de la luz. Luego se leyó contra un blanco (metanol P.A.) a 517 nm. La absorbancia de esta solución debe ser mayor a 0,700 (solución A).

Las soluciones metanólicas de los extractos fueron preparadas a diversas concentraciones en un rango de 2-12 $\mu\text{g/mL}$. Los patrones utilizados fueron ácido gálico y quercetina de ambos patrones se prepararon soluciones metanólicas en un rango de concentración de 2-10 $\mu\text{g/mL}$.

Posteriormente, la reacción se inició incorporando directamente en la cubeta de cuarzo 975 μL de DPPH y 25 μL de muestra (Brand-Williams, 1995). Para cada muestra el blanco consistió en 975 μL de metanol y 25 μL de muestra. Se monitoreó la reacción a 517 nm por un mínimo de 20 min y un máximo de 120 min dependiendo del tiempo en que cada muestra se demoró en llegar al estado estacionario. Además, se determinó la absorbancia en el grupo control que consistió en 975 μL de DPPH y 25 μL de metanol.

3.3.2. Tratamiento de datos

La cinética de la reacción de los extractos con el radical DPPH·, se monitoreó para cada concentración evaluada, y al alcanzar el estado estacionario se calculó el %DPPH remanente (%DPPH·_{rem}), aplicando la siguiente fórmula:

Formula 3:

$$\%DPPH\cdot_{rem} = \left(\frac{A_{SS}}{A_O} \right) \times 100$$

Dónde:

- A_{SS} = Absorbancia en el estado estacionario
- A_O = Absorbancia del grupo control

Se trabajó en el estado estacionario para asegurar que la reacción no continuara. Se construyeron gráficos de %DPPH·_{rem} vs. concentración (ppm), para determinar gráficamente la CE_{50} , que se define como la concentración de antioxidante necesaria para disminuir en un 50% la concentración inicial de DPPH, utilizando el programa Graph Pad Prism versión 5.01. Posteriormente se determinó gráficamente el tiempo necesario para que la CE_{50} alcance su estado estacionario (TCE_{50}), con estos dos parámetros se determinó la eficiencia antioxidante, con la siguiente fórmula:

Fórmula 4:

$$EA = \frac{1}{CE_{50} \times TCE_{50}}$$

Dónde:

- CE_{50} = Concentración efectiva 50
- TCE_{50} = Tiempo necesario para que EC_{50} alcance su estado estacionario

Además se calculó el % atrapamiento del radical DPPH por las muestras evaluadas, a una concentración común para los EET (5 ppm) mediante la siguiente fórmula:

Fórmula 5:

$$\% \text{Atrapamiento} = \left(\frac{A_0 - A_{SS}}{A_0} \right) \times 100$$

Dónde:

- A_{SS} = Absorbancia al alcanzar el estado estacionario
- A_0 = Absorbancia del grupo control

Los datos se graficaron % inhibición vs. g ácido gálico/100g extracto seco, para poder comparar entre los diversos ecotipos su capacidad antioxidante respecto a su contenido en fenoles totales, los datos se trabajaron con un $n=3$, utilizando el programa Graph Pad Prism versión 5.01. La significancia de los resultados fue determinada por el método de ANOVA de dos vías y análisis de comparaciones múltiples de Kruskal-Wallis.

V. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

1. Estudios químicos

1.1. Extracción

Debido al proceso de secado del material vegetal, la pérdida promedio en peso por secado de los 7 ecotipos correspondió a un $51,5 \pm 1,3\%$.

1.1.1. Obtención de extractos seriados y sus rendimientos

El rendimiento de la obtención de los extractos se detalla en la **Tabla 5** y se grafica en la

Figura 4, en ambos se puede observar que existe cierta homogeneidad en los rendimientos de las distintas extracciones con la excepción de E-Cau que presentó un rendimiento considerablemente mayor que los demás ecotipos para los EDCM y EET.

Tabla 5: Rendimiento del proceso de extracción de las hojas de *Ugni molinae* de los distintos ecotipos en estudio

	Rendimiento (%)						
	Ecotipos						
	E-Cau	E-1	E-2	E-3	E-4	E-5	E-Chi
EHEX	1,4	1,5	1,4	1,3	1,4	1,3	1,2
EDCM	5,9	2,3	1,4	2,0	2,5	1,9	1,7
EAE	3,7	2,9	1,6	1,4	1,8	1,7	4,4
EET	22,2	15,8	12,1	13,0	12,4	16,1	16,1

EHEX= extracto hexánico de hojas de *U. molinae*; EDCM= extracto en diclorometano de hojas de *U. molinae*; EAE= extracto en acetato de etilo de hojas de *U. molinae*; EET=extracto etanólico de hojas de *U. molinae*

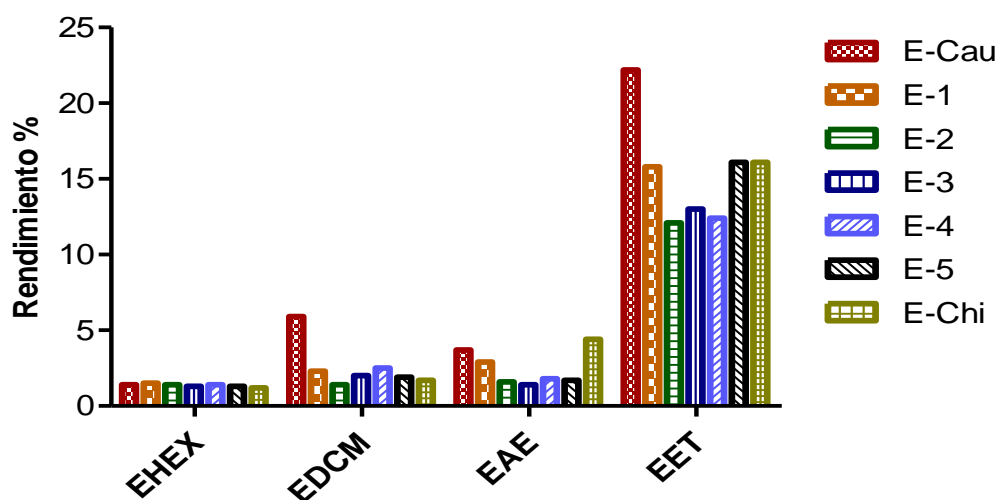


Figura 6: Gráfico comparativo de los rendimientos de extracción de las hojas de los distintos ecotipos de *U. molinae*

EHEX= extracto hexánico de hojas de *U. molinae*; EDCM= extracto en diclorometano de hojas de *U. molinae*; EAE= extracto en acetato de etilo de hojas de *U. molinae*; EET=extracto etanólico de hojas de *U. molinae*

1.2. Determinación de la cantidad de fenoles totales mediante la reacción de Folin-Ciocalteu de los extractos de *U. molinae*

Para determinar la cantidad de fenoles totales en los extractos de los distintos ecotipos de *U. molinae* se obtuvo una curva de calibración de ácido gálico en un rango de concentración 0 a 700 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (Figura 7).

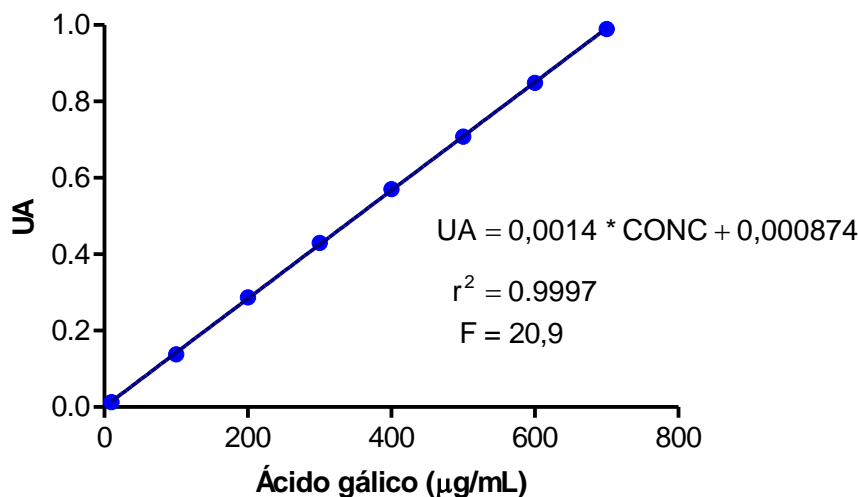


Figura 7: Curva de calibración de ácido gálico para la determinación de fenoles totales por el método de Folin-Ciocalteu

Mediante la cuantificación de fenoles totales, se pudieron establecer diferencias esperables entre los extractos EAE y EET. Los EET de todos los ecotipos mostraron aproximadamente un contenido promedio tres veces mayor de fenoles que los EAE.

Al realizar las diferentes comparaciones de los EAE de los diferentes ecotipos como lo muestra la **Tabla 6**, mediante ANOVA de una vía con un ensayo de comparaciones múltiples de Tukey, se observó que las diferencias entre los ecotipos fue significativa ($P < 0,05$) a excepción de los E4 y E5 que no mostraron diferencias significativas entre ellos.

En el caso de los EET de los ecotipos (**Tabla 7**), las diferencias entre todos los ecotipos fue significativa ($P < 0,05$), según el análisis realizado empleando ANOVA de una vía con un ensayo de comparaciones múltiples de Tukey

Tabla 6: Contenido de fenoles de los distintos ecotipos de *U. molinae* EAE.

Ecotipo	Fenoles totales (mg ácido gálico/ g extracto seco \pm SD)
E1	85,2 \pm 0,2
E2	148,3 \pm 0,5
E3	86,7 \pm 0,5
E4	124,9 \pm 0,5
E5	124,3 \pm 0,5
E-Cau	143,6 \pm 0,3
E-Chi	158,7 \pm 0,2

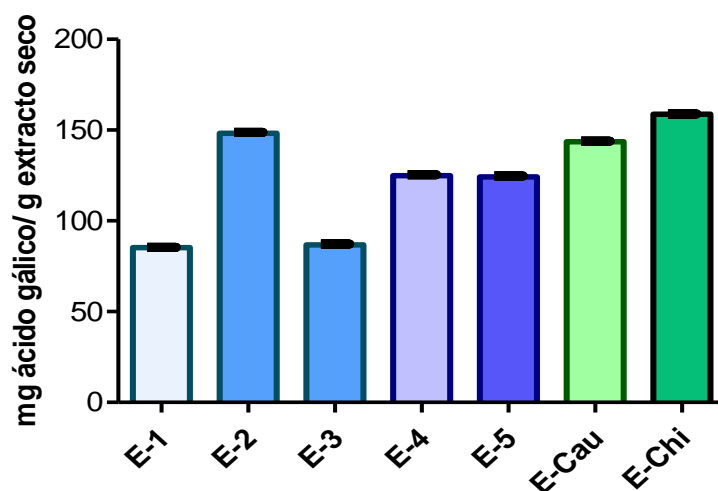


Figura 8: Contenido de fenoles totales expresados en mg ácido gálico/g extracto seco para los extractos EAE de los distintos ecotipos de *U. molinae*

E1= Ecotipo 1; E2= Ecotipo 2; E3= Ecotipo 4; E5=Ecotipo 5;
E-Cau= Ecotipo Cauquenes; E-Chi= Ecotipo Chiloé

Tabla 7: Contenido de fenoles de los distintos ecotipos de *U. molinae* EET.

Ecotipo	Fenoles totales (mg ácido gálico/ g extracto seco \pm SD)
E1	394,2 \pm 0,3
E2	363,5 \pm 0,2
E3	375,7 \pm 0,2
E4	452,5 \pm 0,2
E5	462,4 \pm 0,2
E-Cau	377,6 \pm 0,4
E-Chi	379,2 \pm 0,2

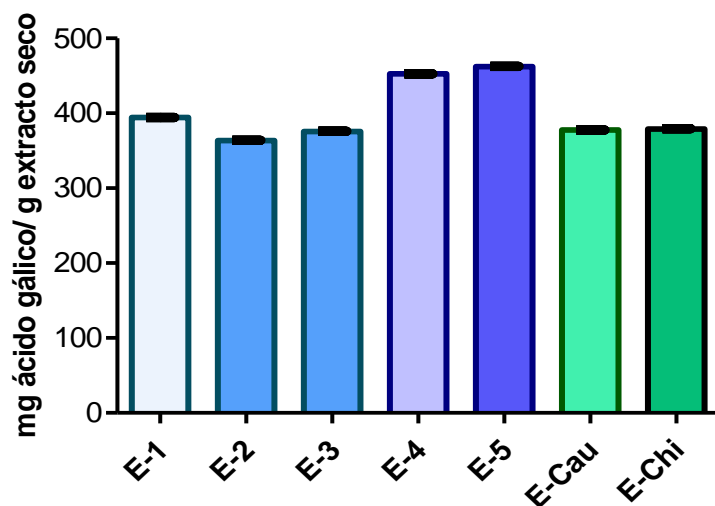


Figura 9: Contenido de fenoles totales expresados en mg ácido gálico/g extracto seco para los extractos EET de los distintos ecotipos de *U. molinae*

E1= Ecotipo 1; E2= Ecotipo 2; E3= Ecotipo 4; E5=Ecotipo 5;
E-Cau= Ecotipo Cauquenes; E-Chi= Ecotipo Chiloé

2. Estudios farmacológicos

2.1. Ensayo de xantina-oxidasa

Las gráficas obtenidas corresponden a un comportamiento sigmoideal (**Figura 10**), esperable al tratarse de una inhibición no competitiva del sitio alostérico de la enzima XO, las gráficas obtenidas fueron linealizadas aplicando logaritmo en ambos ejes (**Figura 11**), posteriormente por regresión lineal se obtuvo las CE_{50} para los 7 ecotipos (**Tabla 8**).

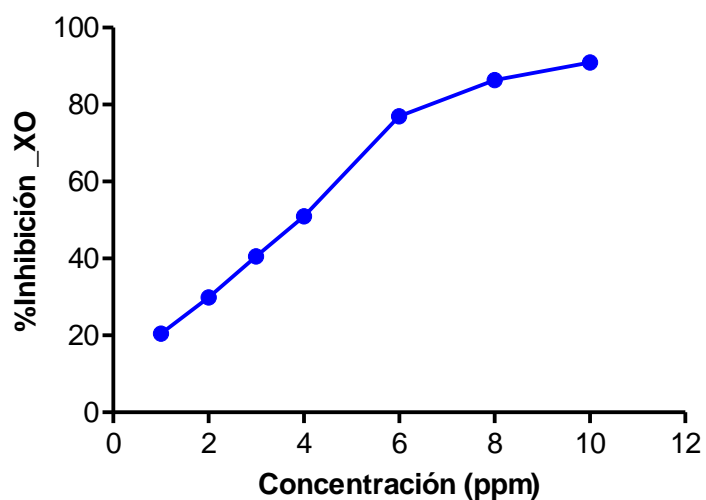


Figura 10: % Inhibición xantino oxidasa vs. concentración (ppm) para el EET del E-Cau.

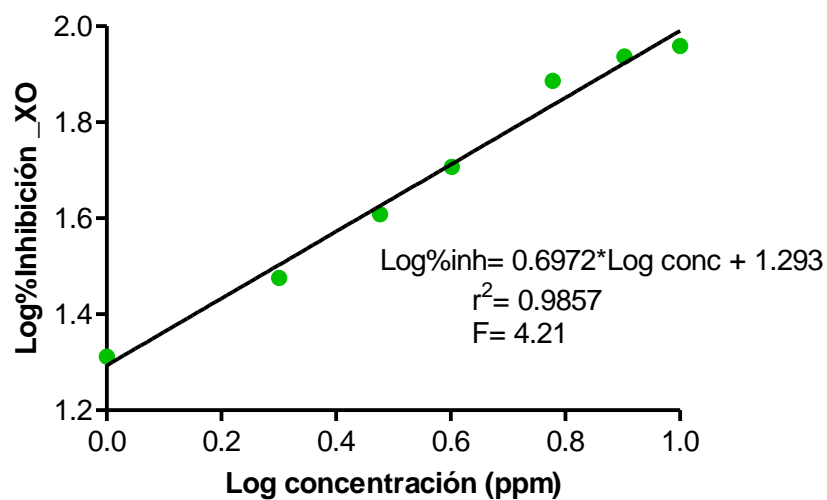


Figura 11: Log % inhibición xantino oxidasa vs. Log concentración (ppm) para el EET del E-Cau.

Al observar los resultados obtenidos destaca que el E3 fue el que presentó mayor potencia con una $CE_{50} = 1,87 \pm 0,03$ y el E-Chi presentó menor potencia con una $CE_{50} = 4,48 \pm 0,03$ (**Tabla 8**). Los gráficos correspondientes a los otros ecotipos se encuentran en la sección de anexos (Anexo 1).

Tabla 8: Concentración efectiva 50 de los distintos ecotipos de *U. molinae* EET.

Ecotipo	Concentración efectiva 50 (ppm \pm SD)
E1	3,65 \pm 0,03
E2	2,94 \pm 0,03
E3	1,87 \pm 0,03
E4	2,22 \pm 0,03
E5	2,64 \pm 0,03
E-Cau	3,83 \pm 0,03
E-Chi	4,48 \pm 0,03

Según la bibliografía consultada, de los flavonoides descritos para los EET de murtila, solo la quercetina ($CE_{50}=2,62 \mu\text{M} \pm 0,13$) y la mirecetina ($CE_{50}=2,38 \mu\text{M} \pm 0,13$) poseen actividad inhibitoria sobre la XO, los derivados de quercetina no poseen actividad sobre la XO por impedimento estérico, ya que se deriva el hidroxilo del C-3 (**Figura 3**) (Cos et al., 1998).

La mirecetina posee actividad tanto inhibitoria sobre la XO y atrapadora sobre el SO y solo el canferol ($CE_{50}=1,06 \mu\text{M} \pm 0,03$) es considerado como inhibidor puro de la XO, sin actividad sobre el SO (Cos et al., 1998).

Podemos suponer por los resultados obtenidos de los diferentes ecotipos de murta que los ecotipos E1, E-Cau y E-Chi, podrían tener un mayor contenido en flavonoides como la quercetina y la mirecetina, así como sus derivados, mientras que el E3 y E4 podrían tener un mayor contenido de canferol y sus derivados.

Debido a que todos los ecotipos fueron cultivados en el mes de abril, y solo los ecotipos E2 y E3 son de la localidad de Porma y los otros ecotipos no comparten localidades, se puede suponer que las diferencias se deben a las condiciones ambientales a las que cada ecotipo fue expuesto durante su desarrollo, lo que condiciona que cada ecotipo posea una actividad ante la XO distinta, presumiblemente por diferencias en el contenido de los flavonoides que poseen mayor capacidad de inhibir la XO.

2.2. Atrapamiento de anión superóxido

Las gráficas obtenidas corresponden a un comportamiento exponencial, con dos fases involucradas (una de mayor velocidad y otra de velocidad lenta) (**Figura 12**), características del atrapamiento de diferentes radicales como el SO, las gráficas obtenidas fueron linealizadas aplicando logaritmo al eje X (**Figura 13**), posteriormente por regresión lineal se obtuvo las CE_{50} para los 7 ecotipos (**Tabla 9**).

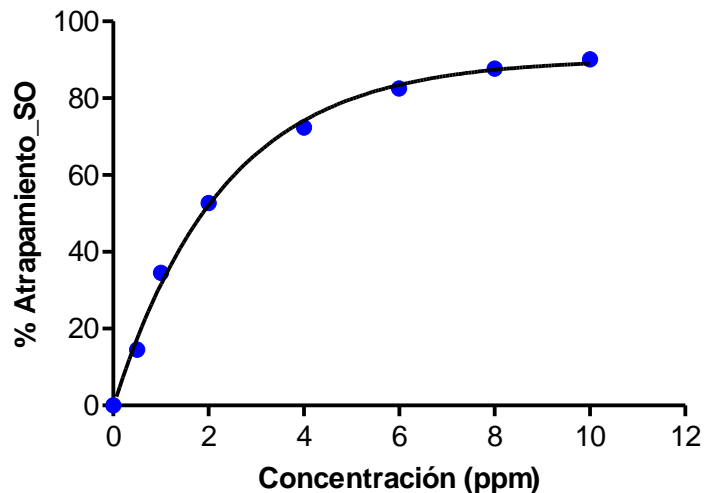


Figura 12: % atrapamiento del anión superóxido (SO) vs. concentración (ppm) para el EET del E2.

Los gráficos correspondientes a los otros ecotipos se encuentran en la sección de anexos (Anexo 2).

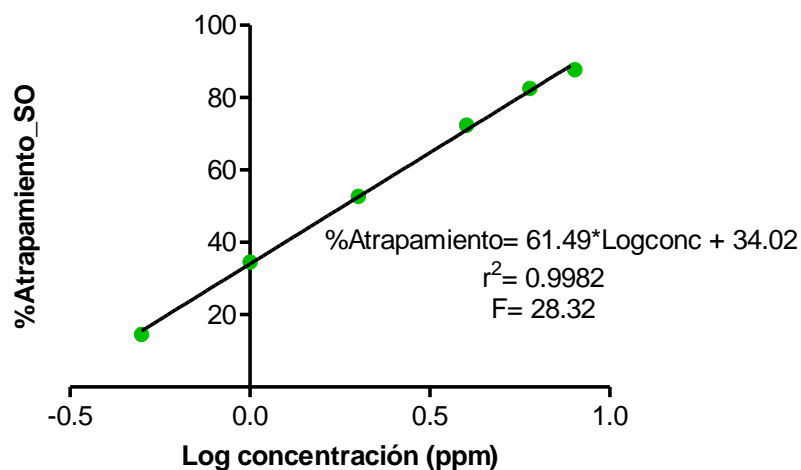


Figura 13: % atrapamiento del anión superóxido (SO) vs. Log concentración (ppm) para el EET del E2.

Al observar los resultados obtenidos destaca que el E4 y el E5 son los ecotipos con mayor capacidad atrapadora del SO, registrando una CE_{50} de $0,50 \pm 0,01$ y $0,96 \pm 0,02$, respectivamente y los E2 y E3 presentaron menor potencia con una $CE_{50} = 1,81 \pm 0,03$ (**Tabla 9**).

Tabla 9: Concentración efectiva 50 de los distintos ecotipos de *U. molinae* EET.

Ecotipo	Concentración efectiva 50 (ppm \pm SD)
E1	1,58 \pm 0,02
E2	1,81 \pm 0,01
E3	1,81 \pm 0,02
E4	0,50 \pm 0,01
E5	0,96 \pm 0,02
E-Cau	1.18 \pm 0,02
E-Chi	1,25 \pm 0,01

De acuerdo a lo discutido anteriormente, de los flavonoides descritos para los EET de murtila, la epicatequina ($CE_{50}= 1,59 \mu\text{M} \pm 0,08$), la quercetina ($CE_{50}=1,63 \mu\text{M} \pm 0,02$), la mirecetina ($CE_{50}=0,33 \mu\text{M} \pm 0,03$) y el epigalato de catequina ($CE_{50}=0.48 \mu\text{M} \pm 0,02$) (**Figura 3**), poseen actividad atrapadora del SO, la presencia de un hidroxilo en el C-3 y C-3' está asociado a una mayor actividad, lo que justifica que flavonoides como el canferol, que no posee el hidroxilo en el C-3, no tenga actividad atrapadora sobre el SO (Cos et al., 1998).

El hecho de que todos los ecotipos presenten una CE_{50} de atrapamiento del anión superóxido menor a la CE_{50} de inhibición de la XO (**Tabla 12**), indican que poseen tanto actividad sobre la XO y el SO, en el caso de la murta, los flavonoides descritos anteriormente poseen hidroxilos en el C-5 y C-7, característica asociada a los compuestos capaces de inhibir a la XO y además atrapar al SO (Cos et al., 1998).

Con los antecedentes presentados y con los resultados obtenidos se puede suponer que los diferentes ecotipos de murta, deben su actividad sobre la XO y el SO por la combinación de los diferentes flavonoides descritos para los EET de hojas de *U. molinae*, debido a que no se conoce con exactitud la composición química de los extractos, solo se puede suponer que ecotipos como E4 y E5 poseen en su composición mayor contenido de mirecetina y sus derivados, por lo que presumiblemente presenten la mayor capacidad de atrapamiento del SO (**Tabla 9**).

Lo anterior presenta directa relación con lo comentado anteriormente sobre las condiciones ambientales a las que cada ecotipo fue expuesto durante su desarrollo, lo que condiciona que cada muestra posea una capacidad atrapadora distinta ligada a las condiciones de su entorno.

2.3. Cinética de atrapamiento del radical DPPH

La cinética de la reacción del atrapamiento del radical DPPH, describe un comportamiento exponencial de 3 fases, una con velocidad rápida, otra con velocidad media y una con velocidad lenta, comportamiento que se observa en los 7 ecotipos evaluados de murta, en la **Figura 14** se observa la cinética de la reacción para el E-Chi.

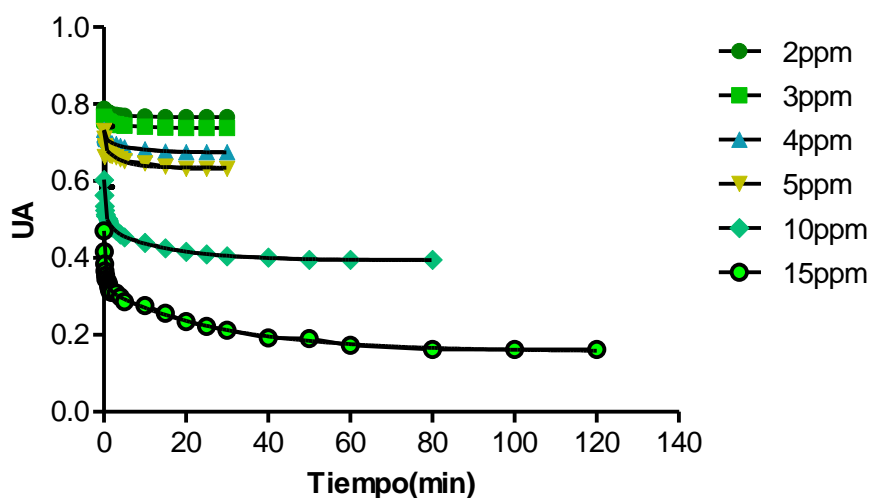


Figura 14: Cinética de atrapamiento del radical DPPH, para el EET del E-Chi.

En el estado estacionario (ss), se calculó el % de DPPH remanente (%DPPHrem) para cada concentración evaluada, de cada ecotipo estudiado de murta y se graficó vs la concentración (ppm) y por regresión lineal se calcularon las CE_{50} para los 7 ecotipos y los patrones (**Figura 15**).

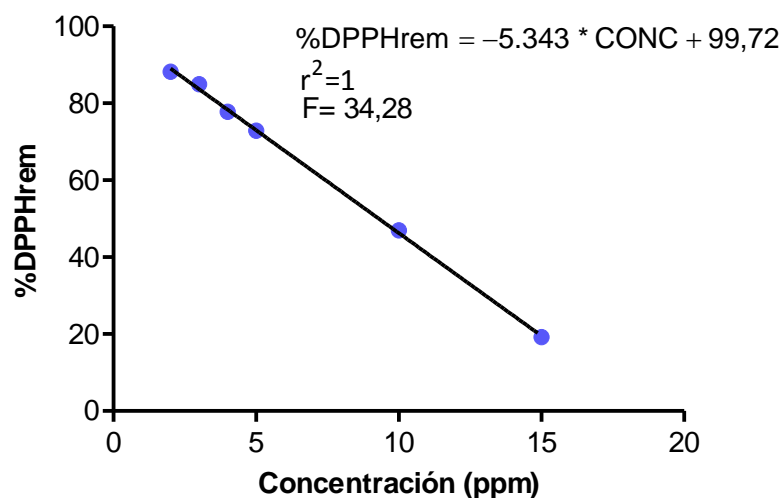


Figura 15: %DPPH remanente (%DPPHrem) vs. concentración (ppm), para el EET del E-Chi extracto etanólico.

El ecotipo proveniente de Cauquenes fue el que presentó mayor capacidad atrapadora del radical DPPH, seguido del E3 (Tabla 10), en comparación el E2 presentó la menor capacidad de atrapar el radical DPPH (Tabla 10).

Tabla 10: Concentración efectiva 50 de los distintos ecotipos de *U. molinae* EET y los patrones evaluados.

Ecotipo	Concentración efectiva 50 (ppm ± SD)
E1	7,81 ± 0,22
E2	12,50 ± 0,14
E3	8,06 ± 0,25
E4	6,93 ± 0,18
E5	7,43 ± 0,21
E-Cau	5,95 ± 0,24
E-Chi	9,31 ± 0,16
Ácido gálico	4,84 ± 0,22
Quercetina	5,56 ± 0,17

Con los datos de CE_{50} se determinó el tiempo en que cada CE_{50} llegó a su ss (**Figura 16**), para posteriormente determinar la eficiencia antioxidante de cada ecotipo (**Tabla 11**). Los gráficos correspondientes a los otros ecotipos se encuentran en la sección de anexos (Anexo 3).

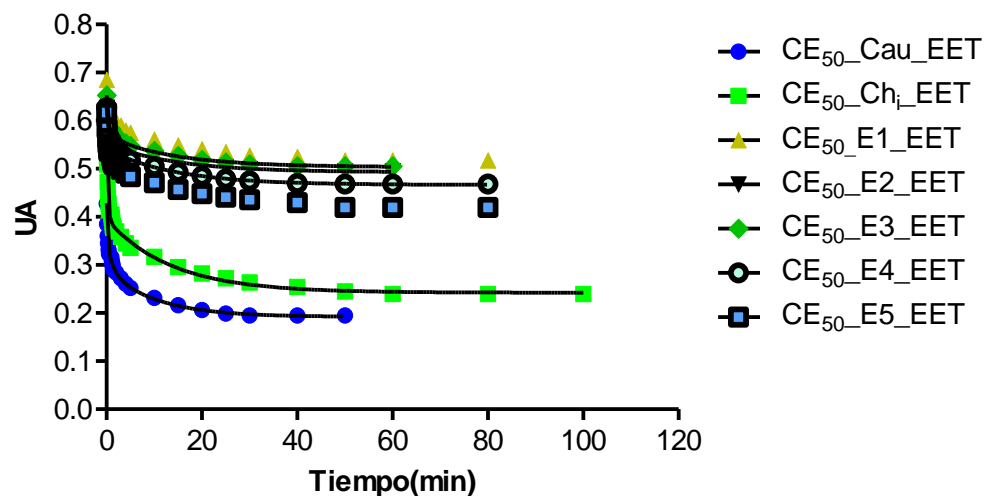


Figura 16: Cinética de atrapamiento del radical DPPH, para las CE_{50} de los ecotipos evaluados de *U. molinae*.

Tabla 11: CE_{50} , TCE_{50} y EA de los distintos ecotipos de *U. molinae* EET y los patrones evaluados.

Ecotipo	CE_{50} (ppm \pm SD)	TCE_{50} (min \pm SD)	EA ($\times 10^{-3}$ \pm SD)
E1	7,81 \pm 0,22	50 \pm 2	2,56 \pm 0,24
E2	12,50 \pm 0,14	40 \pm 4	2,00 \pm 0,12
E3	8,06 \pm 0,25	40 \pm 5	3,10 \pm 0,26
E4	6,93 \pm 0,18	50 \pm 6	2,88 \pm 0,22
E5	7,43 \pm 0,21	50 \pm 2	2,69 \pm 0,20
E-Cau	5,95 \pm 0,24	30 \pm 4	5,60 \pm 0,24
E-Chi	9,31 \pm 0,16	60 \pm 5	1,79 \pm 0,16
Ácido gálico	4,84 \pm 0,22	54 \pm 2	3,82 \pm 0,22
Quercetina	5,56 \pm 0,17	66 \pm 6	2,72 \pm 0,17

La eficiencia antioxidante es un parámetro que permite evaluar cada ecotipo considerando su CE_{50} y el tiempo que demoran en atrapar el 50% de DPPH, esto es importante ya que un buen antioxidante es aquel que posee potencia (menor CE_{50}) y a su vez lo hace en corto tiempo, dos condiciones necesarias para evitar y prevenir el daño ocasionado por el estrés oxidativo (Villaño et al., 2007).

Para los ecotipos evaluados fue el E-Cau el que presentó una mayor EA de $5,60 \pm 0,24$ y a su vez el E-Chi fue el que presentó una menor EA correspondiente a $1,79 \pm 0,16$ (**Tabla 11**). Con estos resultados se puede presumir que el E-Cau posea en su EET, un mayor contenido de ácido gálico y sus derivados, ya que este tanino es capaz de reaccionar con 7 moléculas de DPPH a la vez, ya que en su estructura posee 3 grupos hidroxilos disponibles para reaccionar con el radical DPPH como se observa en la **Figura 17**, es importante destacar que los mecanismos de reacción involucrados con el radical DPPH no se conocen con exactitud, ya que antioxidantes como el sesamol (**Figura 17**) poseen una cinética de reacción rápida y son capaces de reaccionar con 3 moléculas de DPPH, en contraste con el ácido gálico que es de cinética lenta y reacciona con 7 moléculas (Mishra et al., 2011).

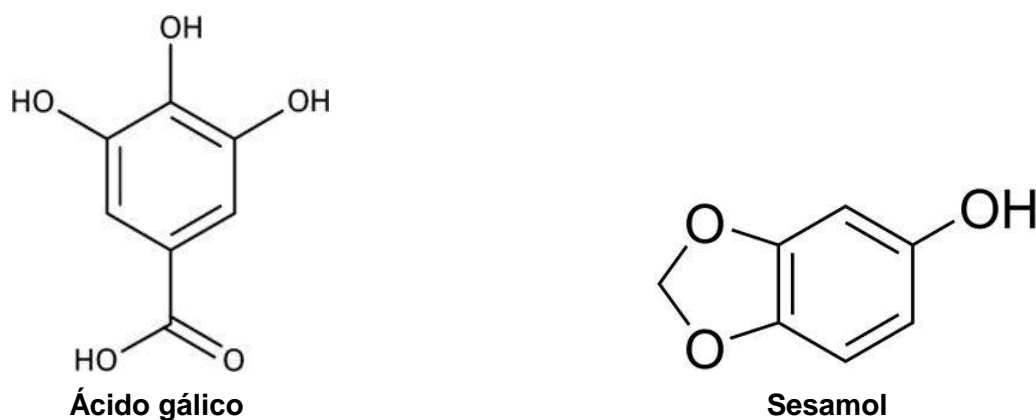


Figura 17: Estructuras químicas correspondientes al ácido gálico y al sesamol.

Como se comentó previamente, aunque se conoce el modelo de cinética que caracteriza a la reacción con el radical DPPH (exponencial de 3 fases), no se sabe con exactitud como es el proceso de interacción entre las moléculas de DPPH y la molécula de antioxidante. En el caso de los EET de los ecotipos evaluados, se puede presumir que es el conjunto de taninos y flavonoides presentes en cada ecotipo, lo que les da su eficiencia antioxidante ya que no se cuenta con la composición química completa en polifenoles de los extractos evaluados que permitan establecer mayores diferencias entre los ecotipos, a pesar de esto, se puede establecer que existen diferencias en los EET de los ecotipos evaluados, por ejemplo en la **Figura 18**, se observa que los ecotipos con mayor contenido en polifenoles E4 y E5, no son los más potentes como atrapadores del radical DPPH (**Tabla 12**).

Como se dijo anteriormente el E-Cau fue el que presentó mayor potencia atrapadora del radical DPPH con un contenido menor de polifenoles respecto de los E4 y E5. La potencia de E-Cau, se podría explicar suponiendo que posee un mayor contenido en taninos como el ácido gálico y sus derivados, descritos para los extractos metanólicos y acuosos de *U. molinae* (Rubilar et al., 2006).

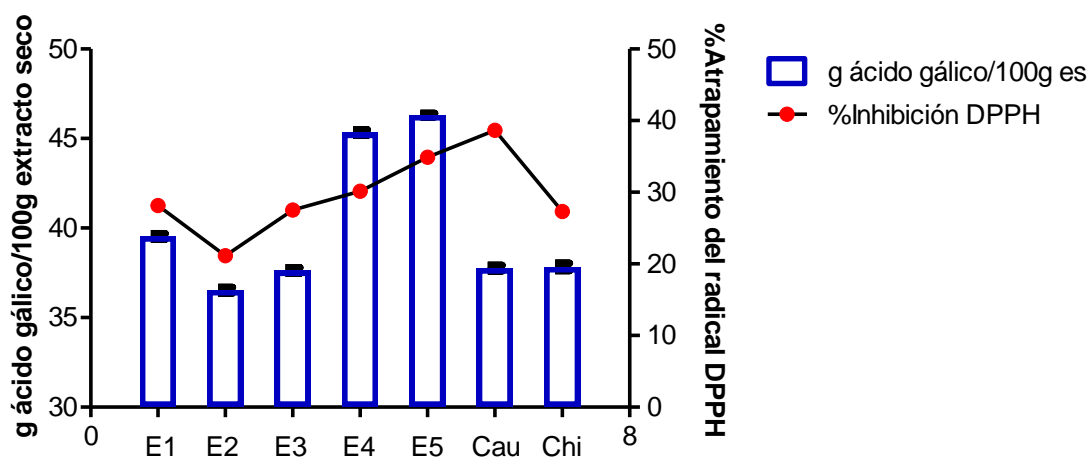


Figura 18: Contenido de fenoles totales vs. % inhibición del radical DPPH (5ppm) para los 7 ecotipos evaluados de *U. molinae*.

En la **Tabla 12** se presenta un resumen de los resultados obtenidos, es importante destacar la importancia de conocer completamente la composición química de los EET obtenidos para poder discutir con mayor profundidad y alcanzar mejores conclusiones que permitan explicar por ejemplo como el E-Cau siendo el que presentó una mayor capacidad atrapadora del radical DPPH, no fue el que tuvo la mayor potencia frente a la XO y el SO, al igual que el E5 que resultó ser de los ecotipos evaluados el que posee mayor contenido de fenoles totales, pero no fue el más potente en ninguno de los ensayos realizados.

Por lo tanto cabe destacar que la capacidad antioxidante en los ensayos evaluados, permite observar que un alto contenido en polifenoles no desencadena en una buena capacidad antioxidante, ya que esta depende del tipo de polifenoles presentes en los extractos a evaluar, diferencias que se observan claramente en la **Tabla 12**, y que fueron discutidas previamente.

Es importante destacar ciertas diferencias que dan indicios de diferencias en la composición química de los EET evaluados, por ejemplo como se muestra en la **Tabla 12**, el E5 fue el que presentó un mayor contenido en fenoles totales ($462,4 \pm 0,2$), pero no resultó ser el más potente en los ensayos farmacológicos, otro ejemplo interesante fue el E3 que fue el inhibidor más potente de la XO ($1,87 \pm 0,03$) pero no destacó en ningún otro ensayo realizado y el E-Cau que como se mencionó anteriormente fue de los ecotipos evaluados el atrapador más potente del DPPH y el que presentó mayor EA ($6,0 \pm 0,2$ y $5,6 \pm 0,2$ respectivamente)

La única excepción a la regla fue el E4, que podría tener en su EET la combinación justa de polifenoles para una buena actividad antioxidante, el E4 fue el segundo con mayor contenido de polifenoles ($452,5 \pm 0,2$ mg ácido gálico/g es), fue el segundo inhibidor más potente de la XO ($2,22 \pm 0,03$), el inhibidor más potente del SO ($0,50 \pm 0,01$) y el segundo más potente frente al DPPH ($6,9 \pm 0,2$), esta relación no se presentó para la EA ($2,9 \pm 0,2$).

Lo que demuestra que no hay una relación directa entre la potencia atrapadora del radical y una buena eficiencia antioxidante, debido a que como se comentó anteriormente el parámetro EA relaciona potencia y tiempo de reacción con el radical DPPH.

Tabla 12: Resumen de los resultados obtenidos para los distintos ecotipos de *U. molinae* EET.

	FT	XO	SO	DPPH	
	(mg ác gálico/ g es \pm SD)	CE ₅₀ (ppm \pm SD)	CE ₅₀ (ppm \pm SD)	CE ₅₀ (ppm \pm SD)	EA (x10 \pm SD)
E1	394,2 \pm 0,3	3,65 \pm 0,03	1,58 \pm 0,02	7,8 \pm 0,2	2,6 \pm 0,2
E2	363,5 \pm 0,2	2,94 \pm 0,03	1,81 \pm 0,01	12,5 \pm 0,1	2,00 \pm 0,1
E3	375,7 \pm 0,2	1,87 \pm 0,03	1,81 \pm 0,02	8,1 \pm 0,3	3,1 \pm 0,3
E4	452,5 \pm 0,2	2,22 \pm 0,03	0,50 \pm 0,01	6,9 \pm 0,2	2,9 \pm 0,2
E5	462,4 \pm 0,2	2,64 \pm 0,03	0,96 \pm 0,02	7,4 \pm 0,2	2,7 \pm 0,2
E-Cau	377,6 \pm 0,3	3,83 \pm 0,03	1,18 \pm 0,02	6,0 \pm 0,2	5,6 \pm 0,2
E-Chi	379,2 \pm 0,2	4,48 \pm 0,03	1,25 \pm 0,01	9,3 \pm 0,2	1,8 \pm 0,2

FT: fenoles totales. XO: xantino oxidasa. SO: anión superóxido

VI. CONCLUSIONES

- ✓ El rendimiento de la obtención de los extractos presentó cierta homogeneidad con la excepción de E-Cau que presentó un rendimiento considerablemente mayor que los demás ecotipos para los EDCM y EET.
- ✓ Mediante la cuantificación de fenoles totales, se pudieron establecer diferencias esperables entre los extractos EAE y EET. Los EET de todos los ecotipos mostraron aproximadamente un contenido promedio tres veces mayor de fenoles que los EAE.
- ✓ En los EAE de los diferentes ecotipos, se observó que las diferencias entre los estos fue significativa ($P < 0,05$) a excepción de los E4 y E5 que no mostraron diferencias significativas entre ellos. Para los EET de los ecotipos, las diferencias entre todos fue significativa ($P < 0,05$), resultando el EET del E5 el que presentó un mayor contenido en fenoles totales correspondiente a $462,5 \pm 0,2$ mg ácido gálico/g extracto seco.
- ✓ En el ensayo de xantino oxidasa se observó que el E3 fue el que presentó mayor potencia al momento de inhibir a la enzima con una $CE_{50} = 1,87 \pm 0,03$ ppm y el E-Chi fue de los ecotipos evaluados el menos potente con una $CE_{50} = 4,48 \pm 0,03$ ppm.
- ✓ En el ensayo de atrapamiento del anión superóxido se observó que el E4 fue el que presentó mayor capacidad de atrapamiento con una $CE_{50} = 0,50 \pm 0,01$ ppm y los E2 y E3 fueron de los ecotipos evaluados los menos potentes con una CE_{50} de $1,81 \pm 0,02$ ppm para E3 y una CE_{50} de $1,81 \pm 0,01$ ppm para el E2.
- ✓ En el ensayo de cinética de atrapamiento del radical DPPH, el E-Cau fue el que presentó una mayor capacidad atrapadora del radical con una $CE_{50} = 6,0 \pm 0,2$ ppm, y una $EA = 5,6 \times 10^{-3} \pm 0,2$ ppm, de los ecotipos evaluados fue el E2 el que presentó menor capacidad atrapadora del radical DPPH con una $CE_{50} = 12,5 \pm 0,1$ ppm y el E-Chi fue el que resultó con una menor eficiencia antioxidante.

- ✓ Las diferencias observadas entre los distintos ecotipos se puede suponer que se deban en el caso de la xantino oxidasa a la presencia en los EET de un mayor contenido en flavonoides como la quercetina y la mirecetina, así como sus derivados, mientras que el E3 y E4 podrían tener un mayor contenido de canferol y sus derivados.
- ✓ Respecto del ensayo de atrapamiento del anión superóxido todos los ecotipos presentan una CE_{50} de atrapamiento del anión superóxido menor a la CE_{50} de inhibición de la xantino oxidasa lo que indica que poseen tanto actividad sobre la xantino oxidasa y el anión superóxido, en el caso de la murta, los flavonoides descritos capaces de inhibir a la xantino oxidasa y además atrapar al anión superóxido son la epicatequina ($CE_{50}= 1,59 \mu M \pm 0,08$), la quercetina ($CE_{50}=1,63 \mu M \pm 0,02$), la mirecetina ($CE_{50}=0,33 \mu M \pm 0,03$) y el epigalato de catequina ($CE_{50}=0.48 \mu M \pm 0,02$). Por lo que se puede suponer que la mayor actividad del E4 se deba a la presencia de estos flavonoides en su EET.
- ✓ Además se puede suponer que los diferentes ecotipos de murta, deben su actividad sobre la xantino oxidasa y el anión superóxido por la combinación de los diferentes flavonoides descritos para los EET de hojas de *U. molinae*, debido a que no se conoce con exactitud la composición química de los extractos, solo se puede suponer que los ecotipos como E4 y E5 poseen en su composición mayor contenido de mirecetina y sus derivados, por lo que presumiblemente presenten la mayor capacidad de atrapamiento del SO.
- ✓ En el ensayo de cinética de atrapamiento del radical DPPH, la eficiencia antioxidante es un parámetro que permite evaluar cada ecotipo considerando su CE_{50} y el tiempo que demoran en atrapar el 50% de DPPH, esto es importante ya que un buen antioxidante es aquel que posee mayor potencia (menor CE_{50}) y a su vez lo hace en corto tiempo, dos condiciones necesarias para evitar y prevenir el daño ocasionado por el estrés oxidativo (Villaño et al., 2007).

- ✓ Con los resultados obtenidos se puede presumir que en el caso de los EET de los ecotipos evaluados, que es el conjunto de taninos y flavonoides presentes en cada ecotipo, lo que les da su eficiencia antioxidante ya que no se cuenta con la composición química completa en polifenoles de los extractos evaluados que permitan establecer mayores diferencias entre los ecotipos.

- ✓ Estos resultados permiten establecer que variaciones en la ubicación geográfica de los ecotipos modula su actividad antioxidante, y abre la puerta a otros estudios químicos y farmacológicos más detallados de la especie que permitan establecer su composición química en polifenoles, para poder potenciar a los extractos de murtila como fuente de antioxidantes en busca de futuros fitofármacos.

VI. REFERENCIAS

AGUIRRE, M. C., Delporte, C., Backhouse, N., Erazo, S., Letelier, M. E., Cassels, B. K., Silva, X., Alegría, S., Negrete, R., Topical anti-inflammatory activity of 2 α -hydroxy pentacyclic triterpene acids from the leaves of *Ugni molinae*. Bioorganic & Medicinal Chemistry 14 (16): 5673-5677, 2006.

AVELLO, M., Pastene, E. Actividad antioxidante de infusos de *Ugni molinae* Turcz.. Boletín Latinoamericano y del Caribe de Plantas Medicinales y Aromáticas 4 (2): 33-39, 2005.

BAEUERLE, P., Rupec, R., Pahl, H. Reactive oxygen intermediates as second messengers of a general pathogen response. Pathological Biology 44: 29-35, 1996.

BAN, J., Oh, J., Kim, T., Kim, D., Jeong, H.-S., Han, S., Hong, J., Anti-inflammatory and arthritic effects of thiacremonone, a novel sulfurcompound isolated from garlic via inhibition of NF- κ B. Arthritis Research & Therapy 11 (5): R145, 2009.

BRAY, H. G., Thorpe, W. V., 2006. Analysis of Phenolic Compounds of Interest in Metabolism. Methods of Biochemical Analysis. John Wiley & Sons, Inc., pp. 27-52.

BROWNLEE, M., Biochemistry and molecular cell biology of diabetic complications. Nature 414 (6865): 813-820, 2001.

COS, P., Ying L., Calomme, M., Hu, J., Cimanga, K., Van Poel, B., Pieters, L., Vlietink, A., Vanden Berghe, D. Structure-Activity relationship and classification of flavonoids as inhibitors of xanthine oxidase and superoxide scavengers. Journal of Natural Products 61(1): 71-76, 1998.

DELPORTE, C., Backhouse, N., Inostroza, V., Aguirre, M. C., Peredo, N., Silva, X., Negrete, R., Miranda, H. F., Analgesic activity of *Ugni molinae* (murtilla) in mice models of acute pain. Journal of Ethnopharmacology 112 (1): 162-165, 2007.

DELPORTE, C., Backhouse, N., Salinas, P., San-Martín, A., Bórquez, J., Loyola, A., Pharmacotoxicological study of diterpenoids. Bioorganic & Medicinal Chemistry 11 (7): 1187-1190, 2003.

HAYEC, T., Fuhrman, B., Vaya, J., Rosenblat, M., Belinky, P., Coleman, R., Elis, A., Aviram, M. Reduced progression of atherosclerosis in apolipoprotein E-deficient mice following consumption of red wine, or its polyphenols quercetin or catechin, is associated with reduced susceptibility of LDL to oxidation and aggregation. Atherosclerosis 451: 111-118, 1997.

LIN, Ch., CHEN, Ch., CHEN, Ch., LIANG, Y., LIN, J. Molecular modeling of flavonoids that inhibits xanthine oxidase. Biochemical and biophysical research communications 294: 167-172, 2002.

MIDDLETON Jr, Elliot. Inhibition of xanthine oxidase by flavonoids. Biochemical Pharmacology 439: 175-181, 1998.

MISHRA, K., Ojha H., Chaudhury, N. Estimation of antiradical properties of antioxidants using DPPH assay: a critical review and results. Journal of food chemistry. 130: 1036-1043, 2011.

PASTENES, C., Santa Maria, E., Infante, R., Franck, N. Domestication of the Chilean guava (*Ugni molinae* Turcz.), a forest understory shrub, must consider light intensity. Scientia horticulturae. 98: 71-84, 2003.

PIETTA, Pier-Giorgio. Flavonoids as antioxidants. Journal of Natural Products 63(7): 71-76, 2000.

RUBILAR, M., Pinelo, M., Ihl, M., Scheuermann, E., Sineiro, J., Nuñez, M. J., Murta Leaves (*Ugni molinae* Turcz) as a Source of Antioxidant Polyphenols. Journal of Agricultural and Food Chemistry 54 (1): 59-64, 2005.

RUIZ, A., Gutierrez, I., Mardones, C., Vergara, C., Herlitz, E., Vega, M., Dorau, C., Winterhalter, P., Von Baer, D. Polyphenols and antioxidant activity of calafate (*Berberis microphylla*) fruits and other native berries from southern Chile. Journal of Agricultural and Food Chemistry 58 (10): 6081-6089, 2010

SEGUEL, I., Peñaloza, E., Nelba, A., Montenegro, B., Torres, A. Colecta y caracterización molecular de germoplasma de murta (*Ugni molinae*) en Chile. Agro sur. 28(2): 21-34, 1999.

SINGLETON, V. y Rossi, J. Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents. American Journal of Enology and Viticulture, 16, 144–158, (1965).

SUWALSKY, M., Orellana, P., Avello, M., Villena, F., Sotomayor, C. Human erythrocytes are affected in vitro by extracts of *Ugni molinae* leaves. Food and Chemical Toxicology. 44: 1393-1398, 2006.

SUWALSKY, M., Orellana, P., Avello, M., Villena, F. Protective effect of *Ugni molinae* Turcz. Against oxidative damage of human erythrocytes. . Food and Chemical Toxicology. 45: 130-135, 2007.

TAWAHA, K., Feras, Q., Mohammad, G., Mohammad, M, Tamam, E Antioxidant activity and total phenolic content of selected Jordanian plant species. Food Chemistry 104: 1372–1378, 2007.

UNNO, T., Sugimoto, A., Kakuda, T., Xanthine oxidase from the leaves of *Lagerstroemia speciosa* (L.) Pers. Journal of Ethnopharmacology 93: 391-395, 2004.

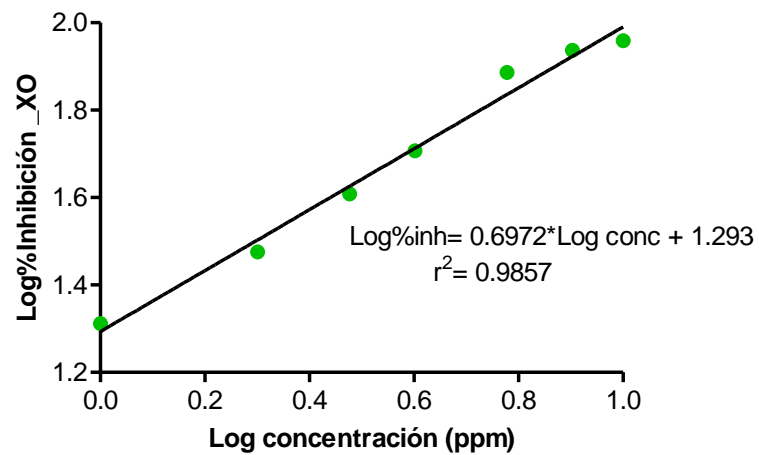
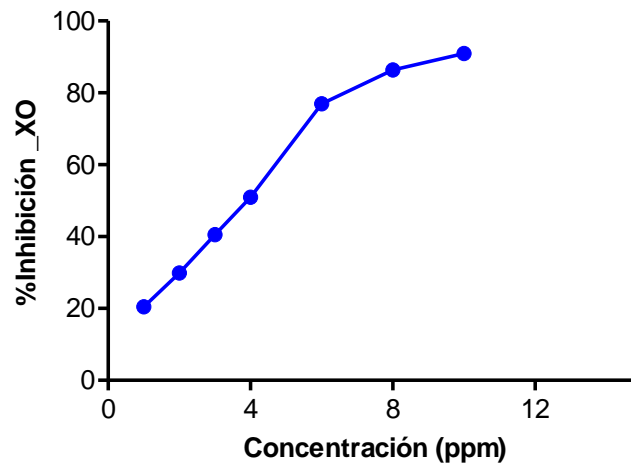
VAN HOORN, D., Nijveldt, R., Leeuwen, P., Hofman, Z., Rabet, L., De Bont, D., Van Norren, K. Accurate prediction of xanthine oxidase inhibition based on the structure of flavonoids. European Journal of pharmacology 451: 111-118, 2002.

VILLAÑO, D., Pachón, M., Moya, M., García, M. Radical scavenging ability of polyphenolic compounds towards DPPH free radical. Talanta 71: 230-235, 2007.

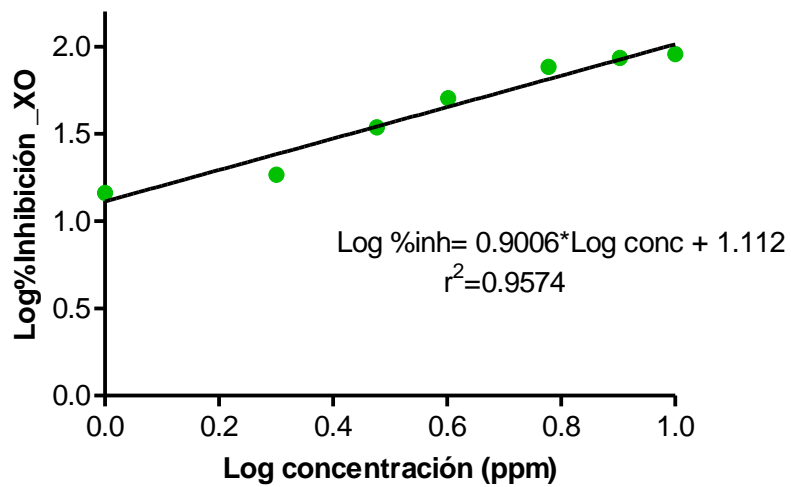
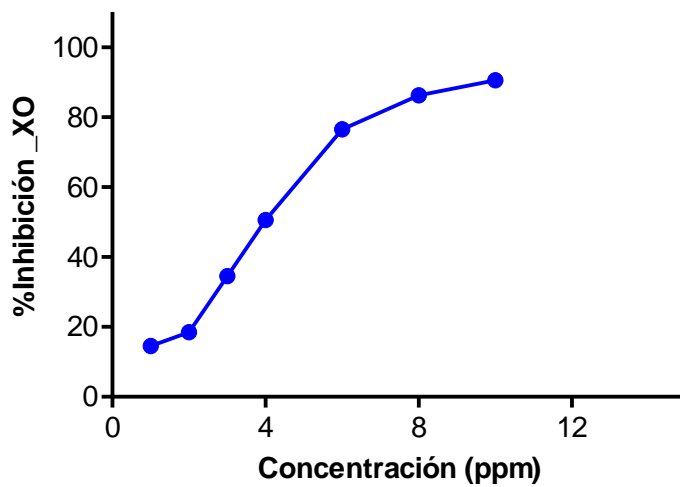
ANEXOS

Anexo 1. Gráficos correspondiente al % Inhibición de la enzima xantino oxidasa (XO) vs. Concentración (ppm) y su linealización aplicando logaritmo de los extractos etanólicos (EET) de los 7 ecotipos evaluados.

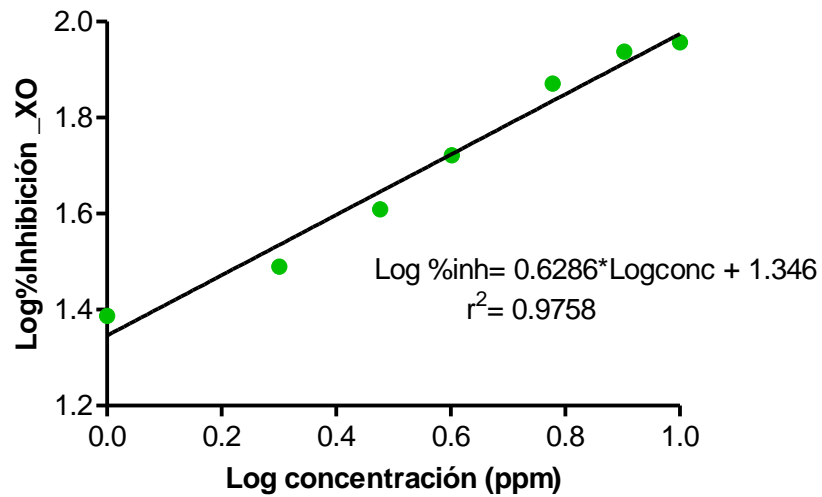
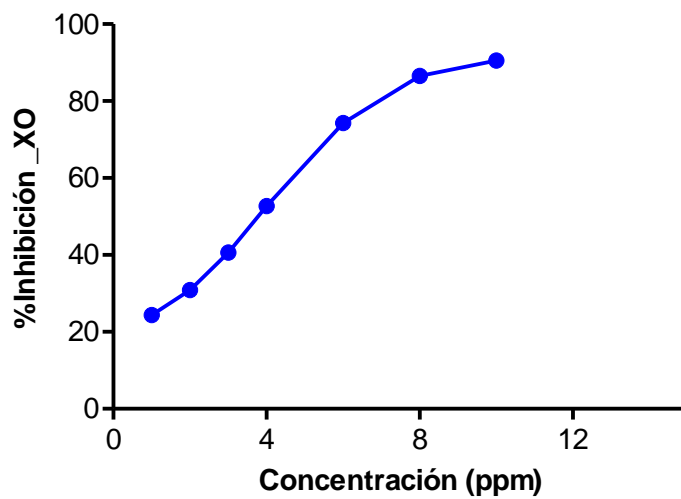
1A. Ecotipo Cauquenes



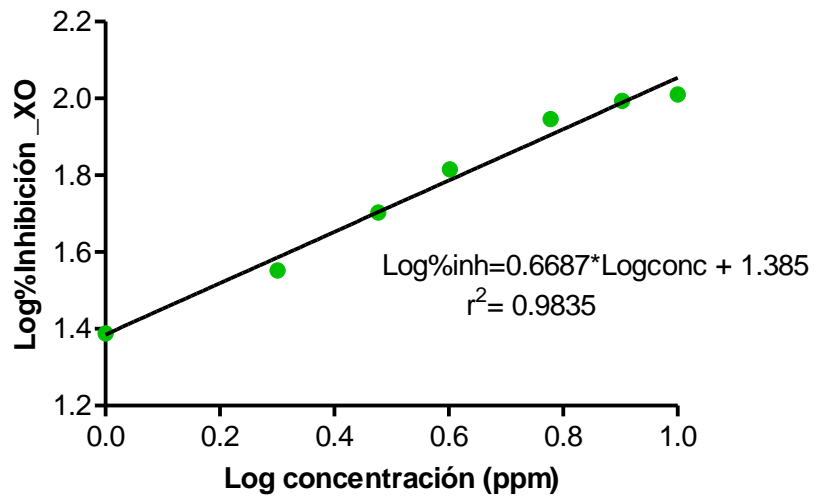
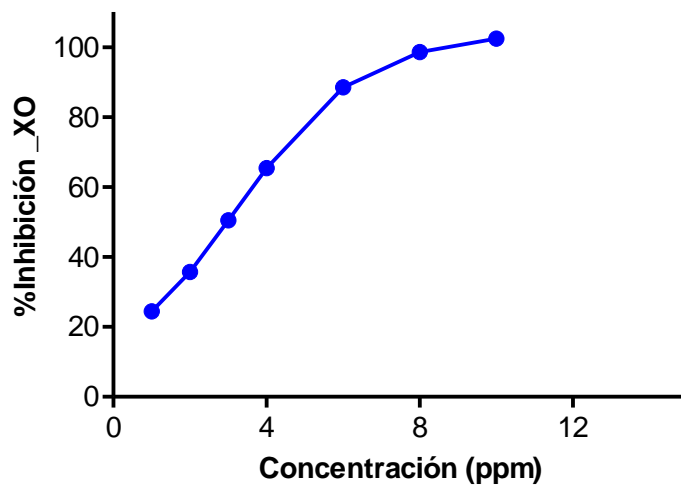
1B. Ecotipo Chiloe



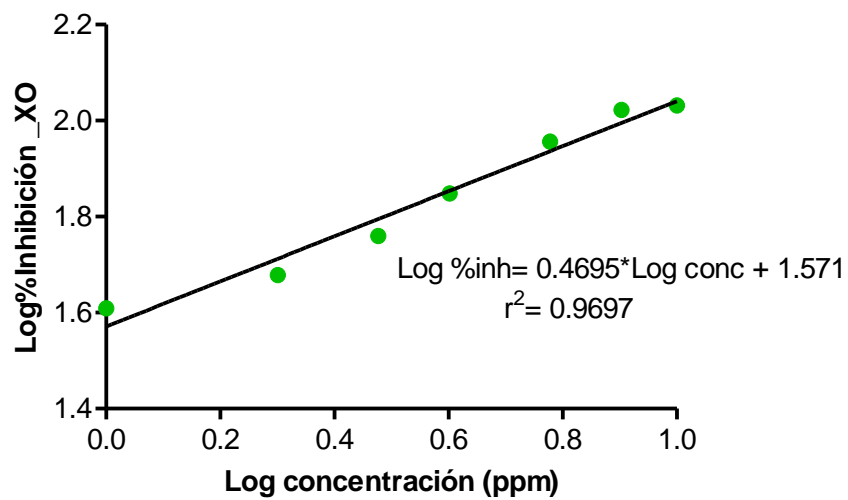
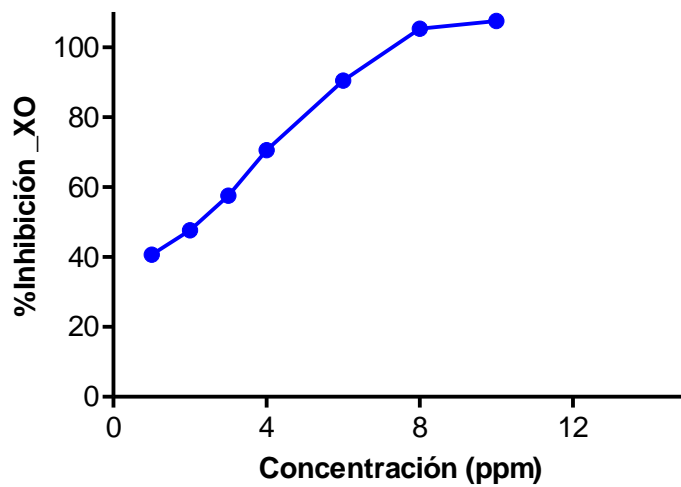
1C. Ecotipo 1



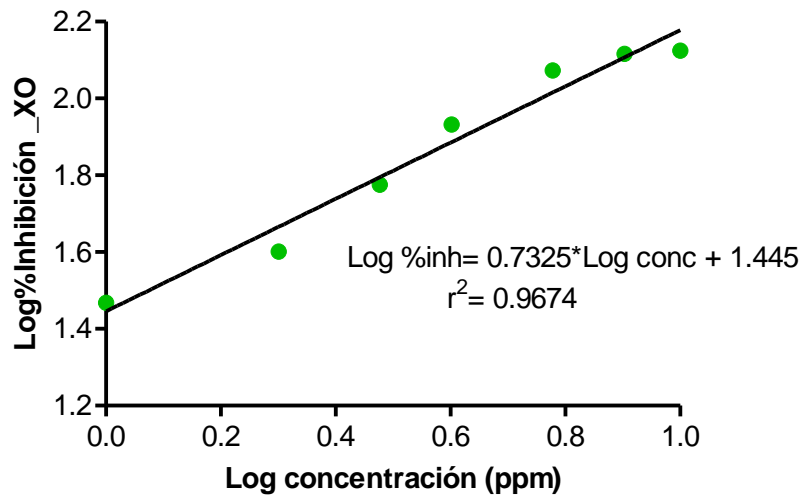
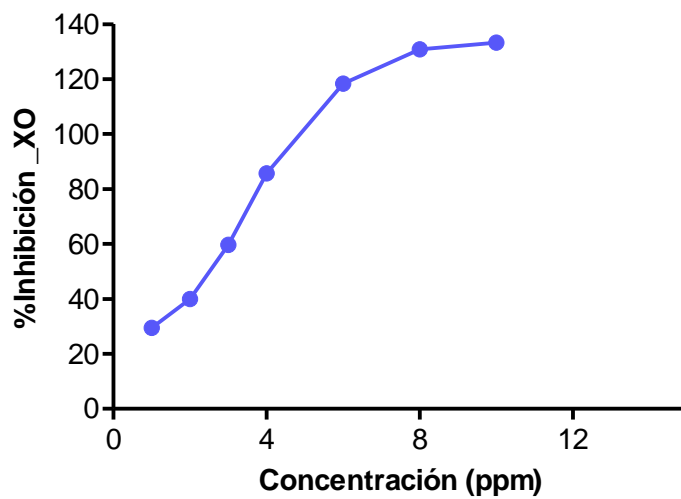
1D. Ecotipo 2



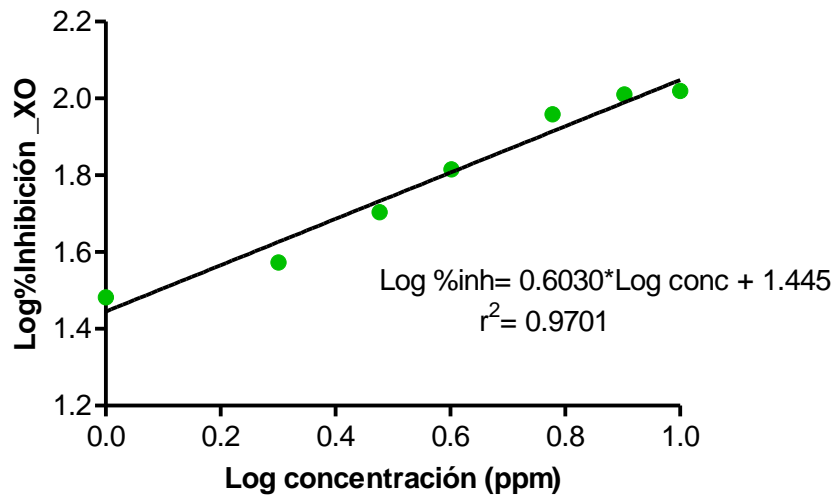
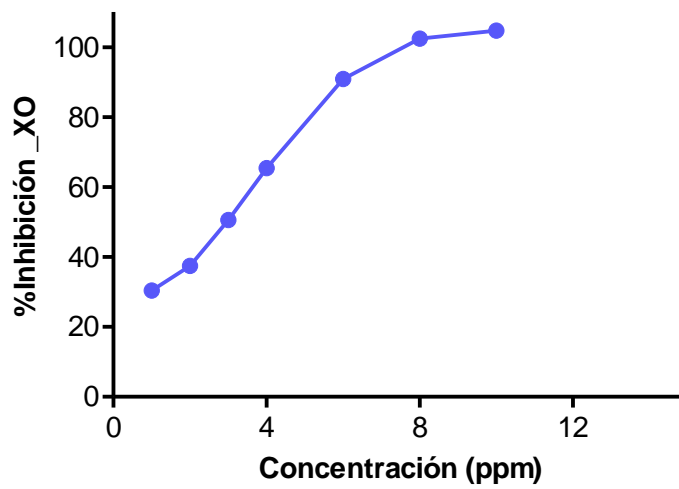
1E. Ecotipo 3



1F. Ecotipo 4

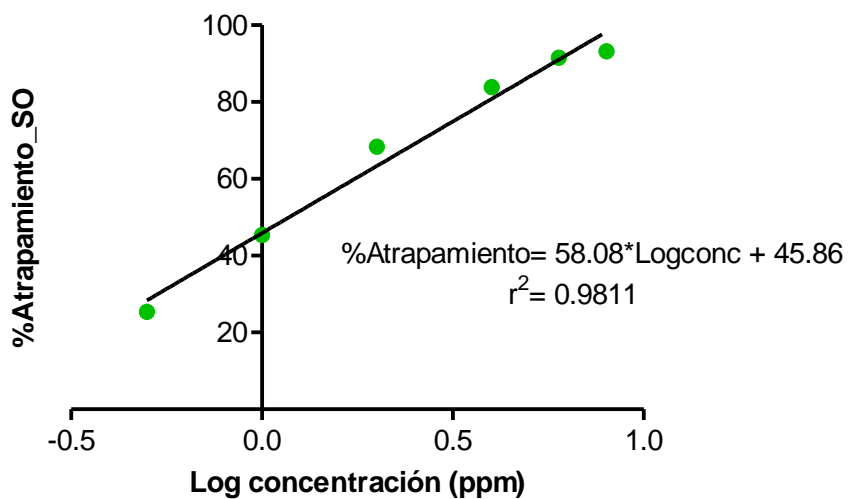
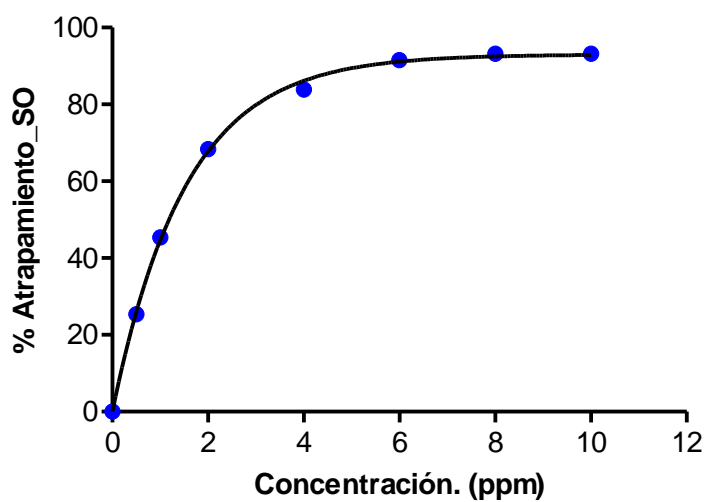


1G. Ecotipo 5

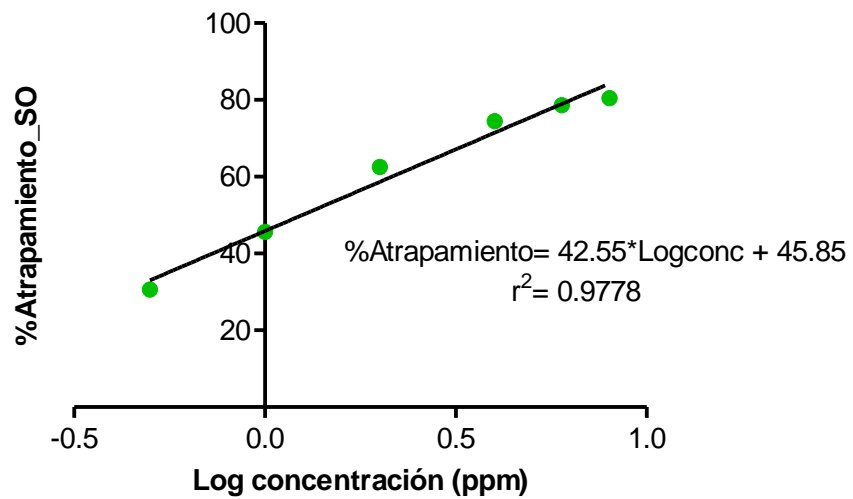
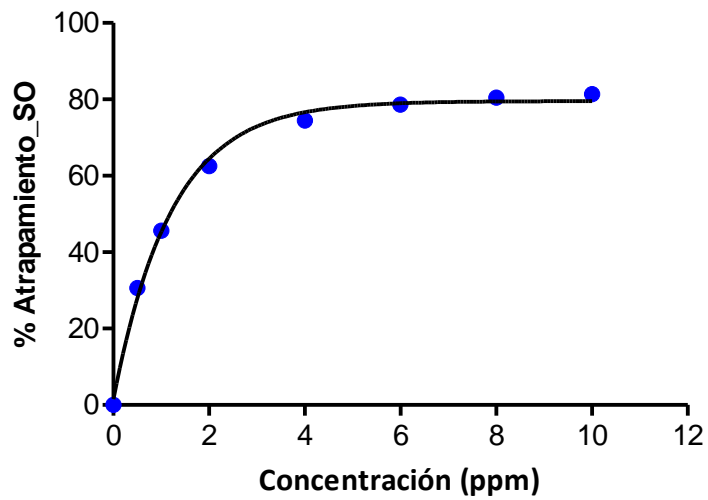


Anexo 2. Gráficos correspondiente al % Atrapamiento del anión superóxido (SO) vs. Concentración (ppm) y su linealización aplicando logaritmo de los extractos etanólicos (EET) de los 7 ecotipos evaluados.

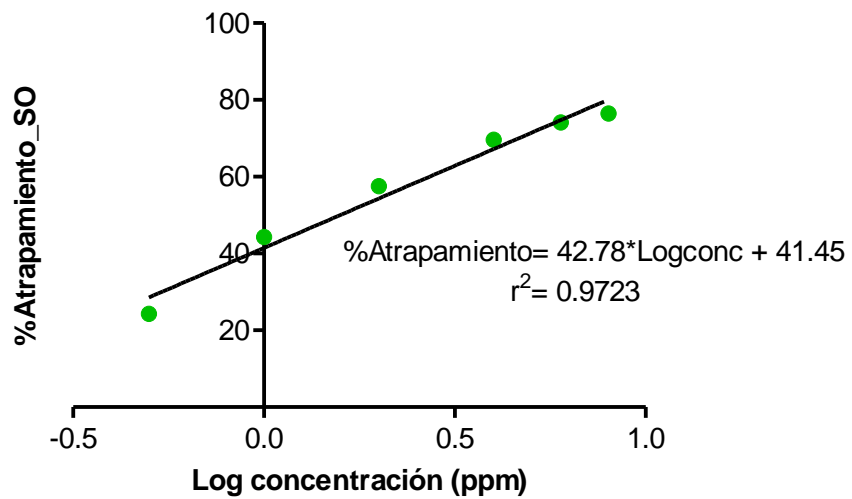
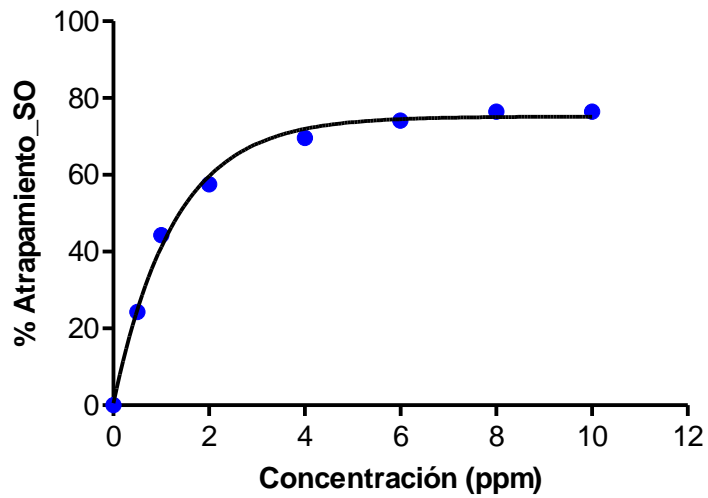
2A. Ecotipo Cauquenes



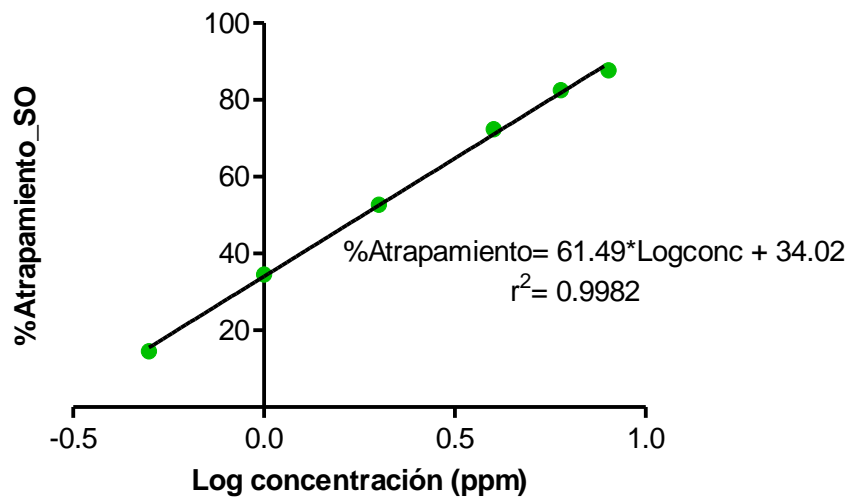
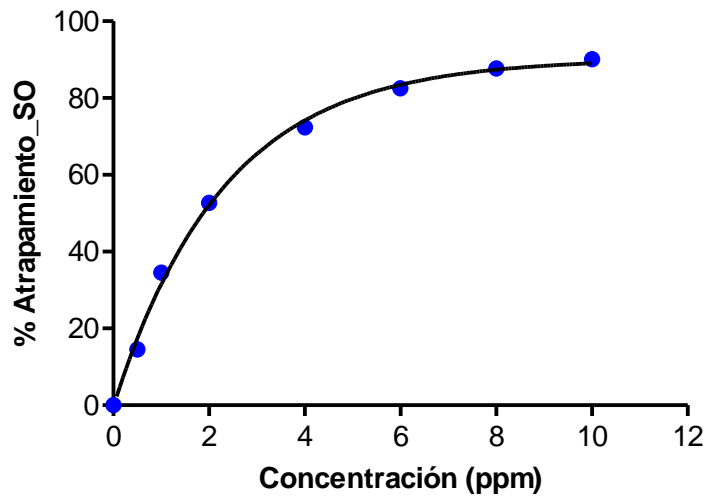
2B. Ecotipo Chiloé



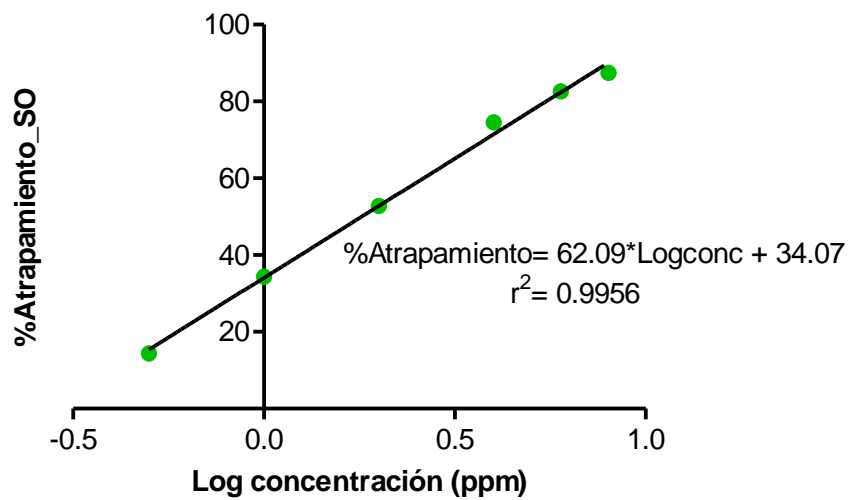
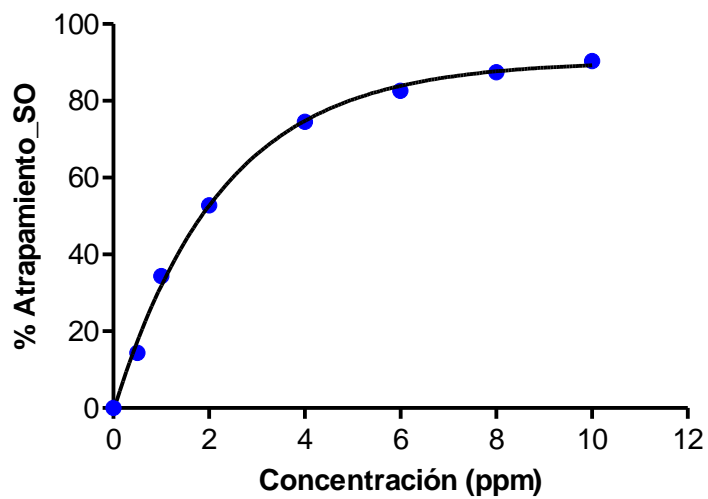
2C. Ecotipo 1



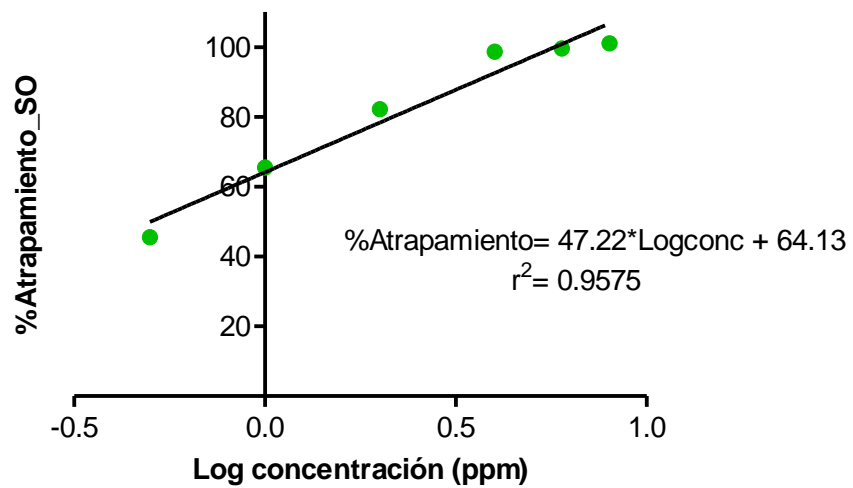
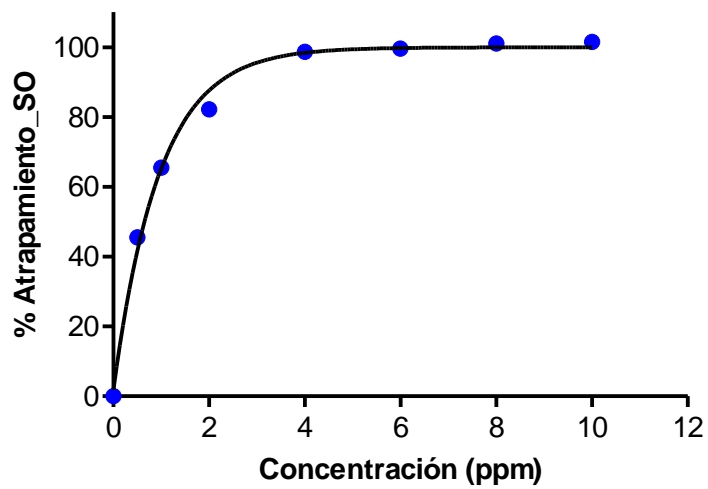
2D. Ecotipo 2



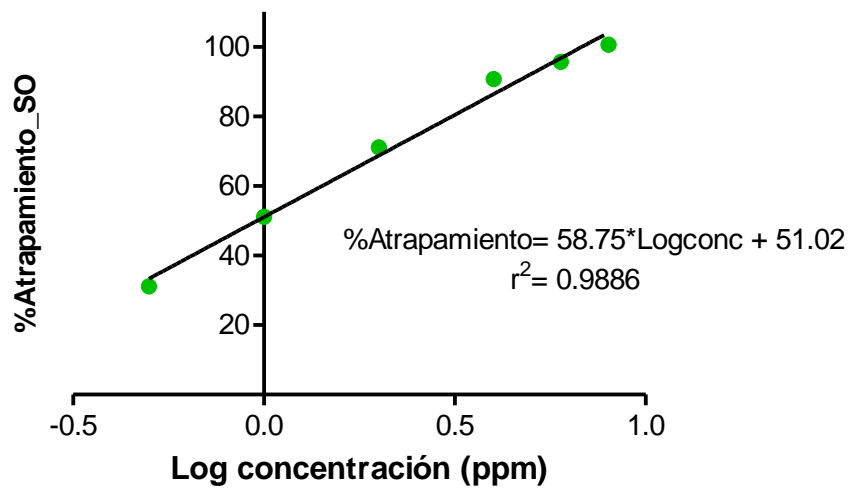
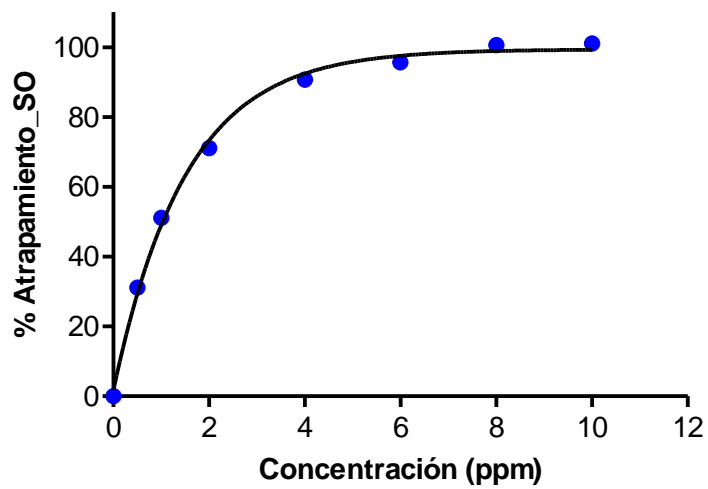
2E. Ecotipo 3



2F. Ecotipo 4

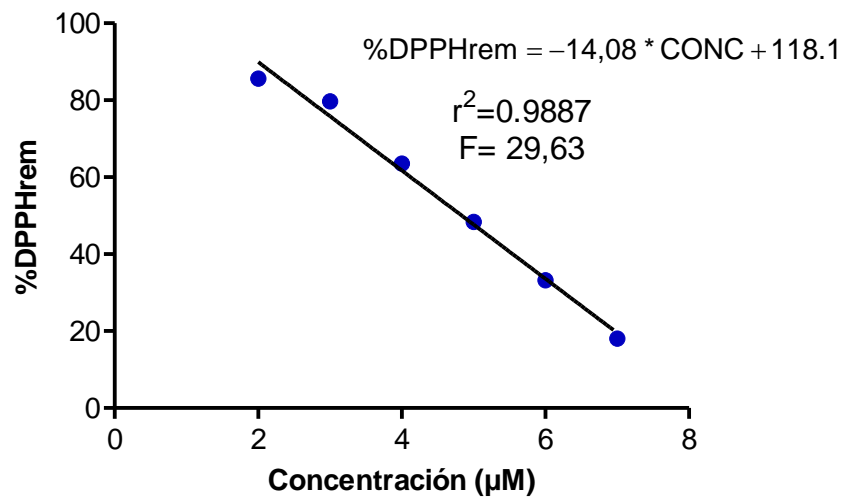
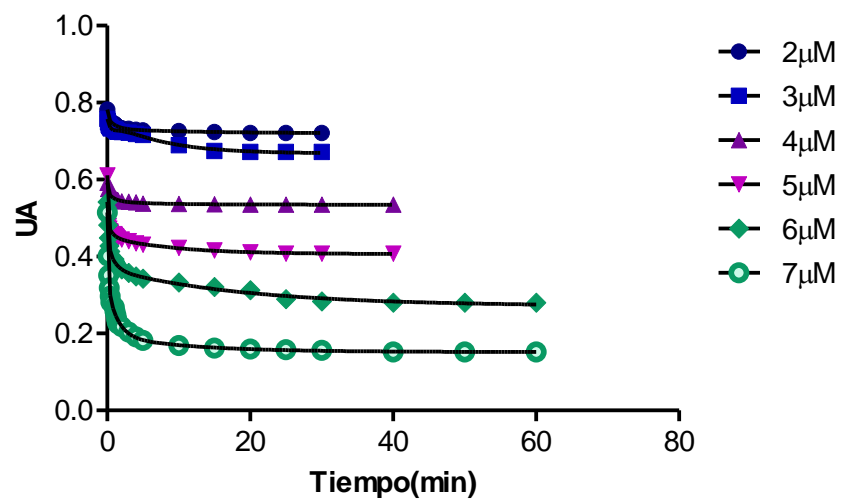


2G. Ecotipo 5

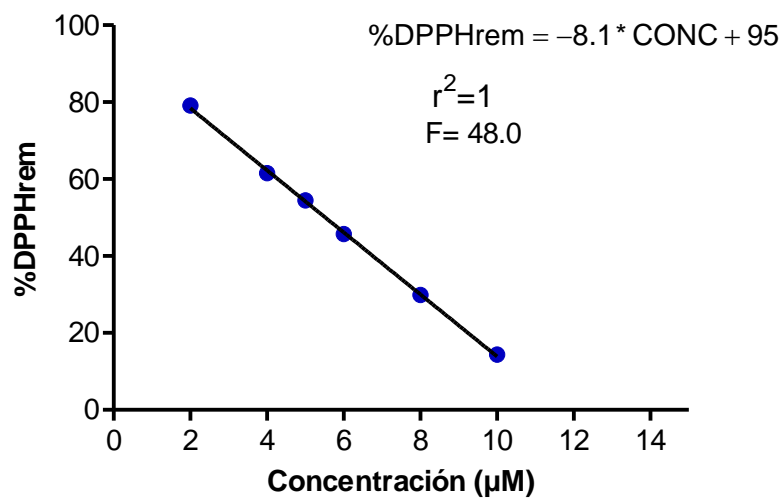
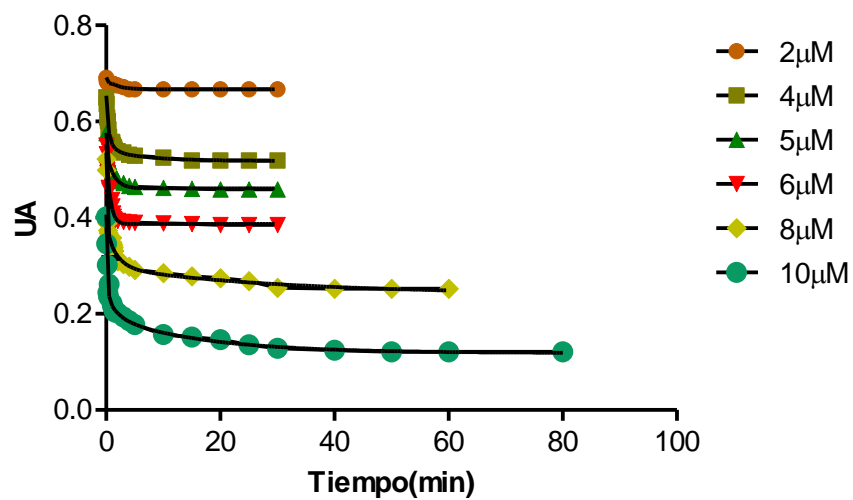


Anexo 3. Gráficos correspondiente a la cinética de atrapamiento del radical DPPH y %DPPH remanente (%DPPHrem) vs. Concentración (ppm) de los extractos etanólicos (EET) de los 7 ecotipos y patrones evaluados.

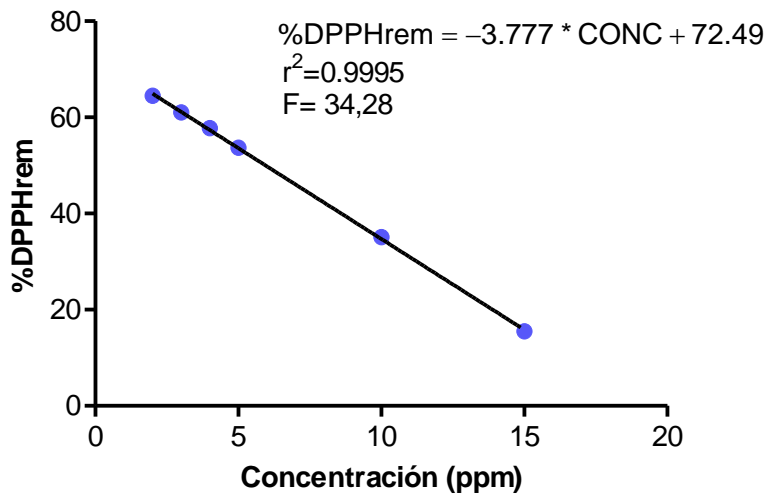
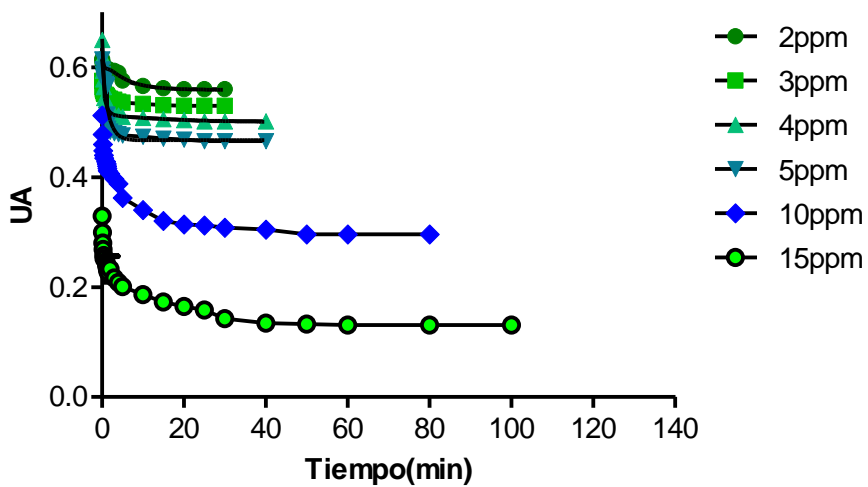
3A. Ácido Gálico



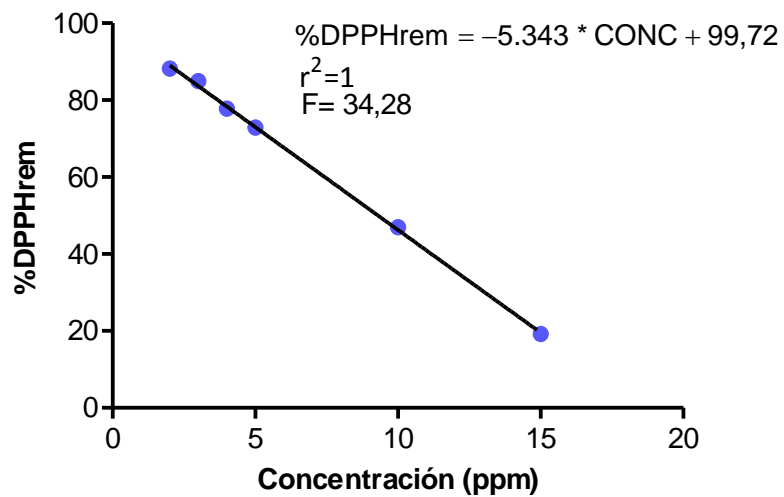
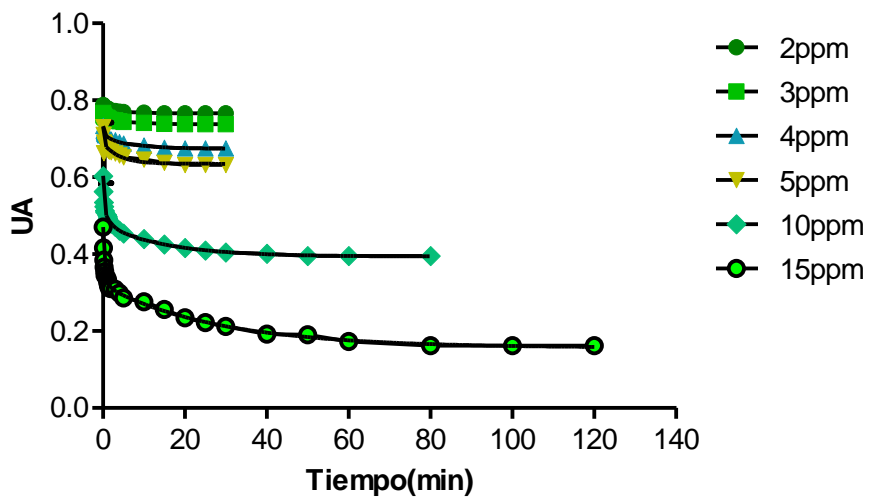
3B. Quercetina



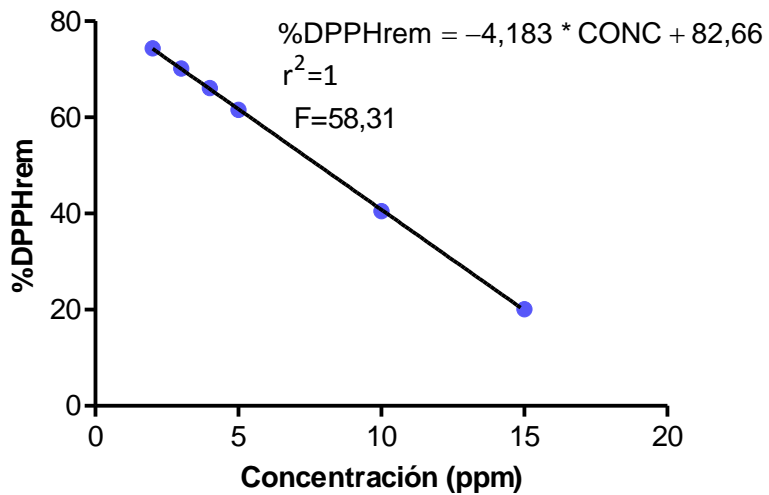
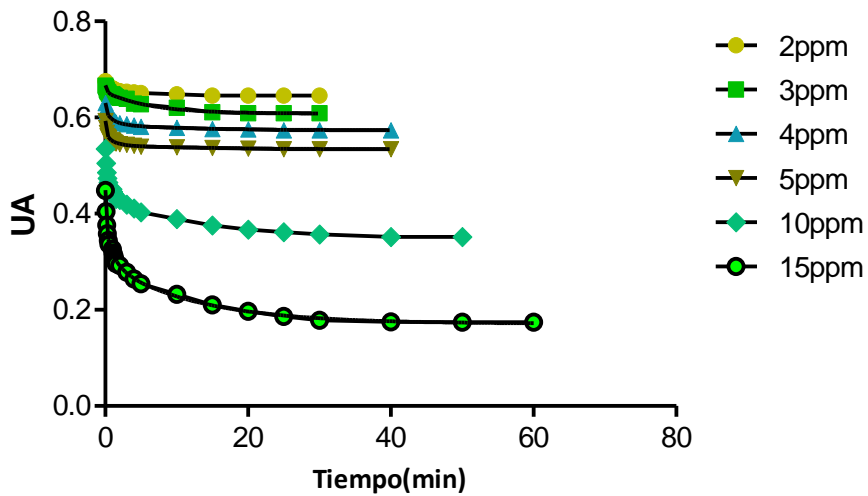
3C. Ecotipo Cauquenes



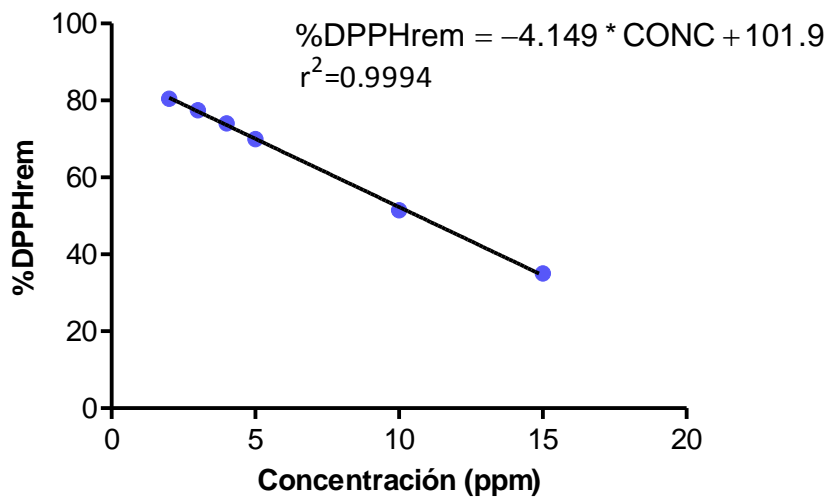
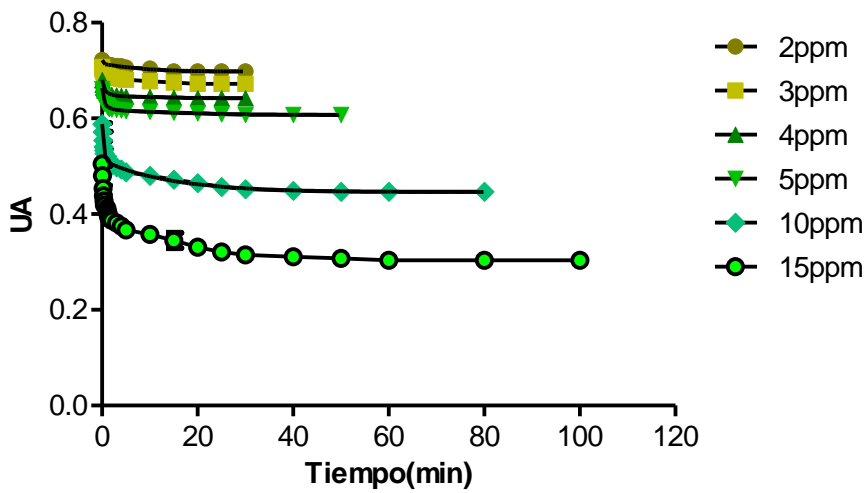
3D. Ecotipo Chiloe



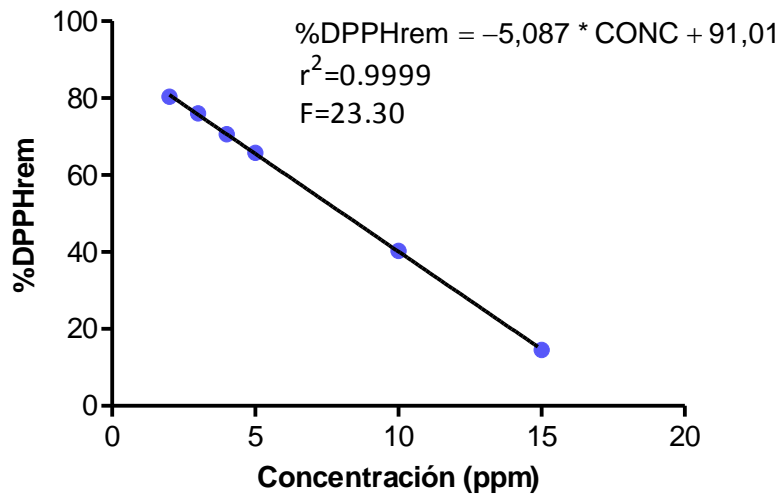
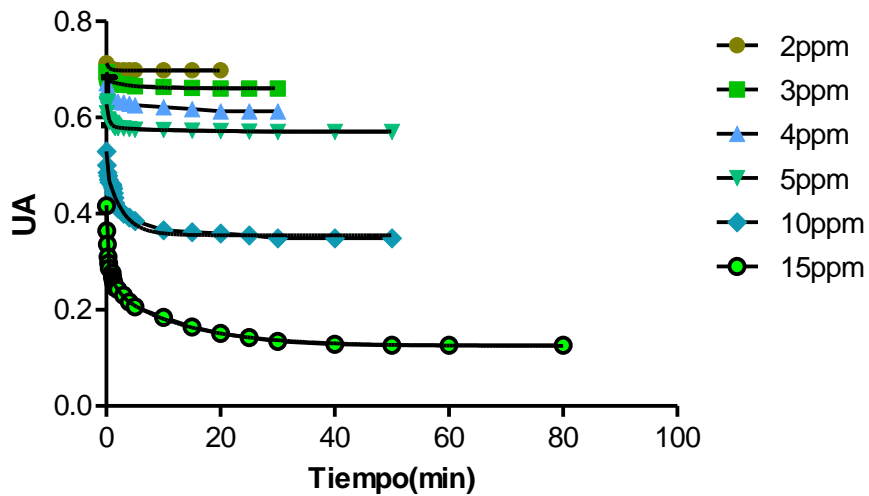
3E. Ecotipo 1



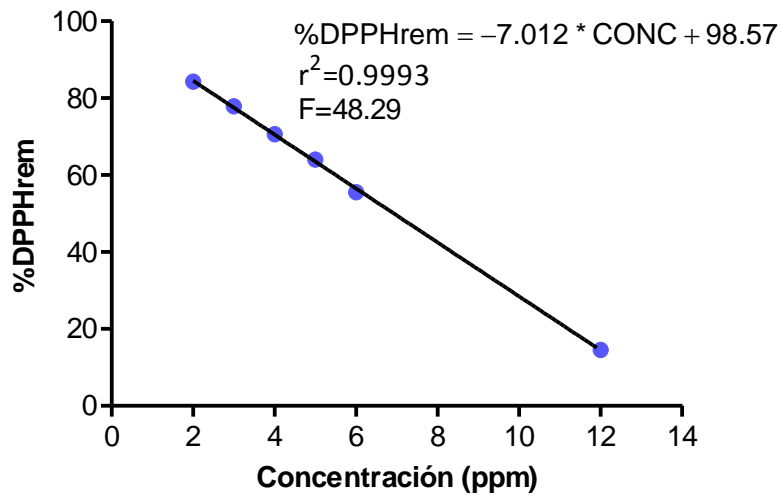
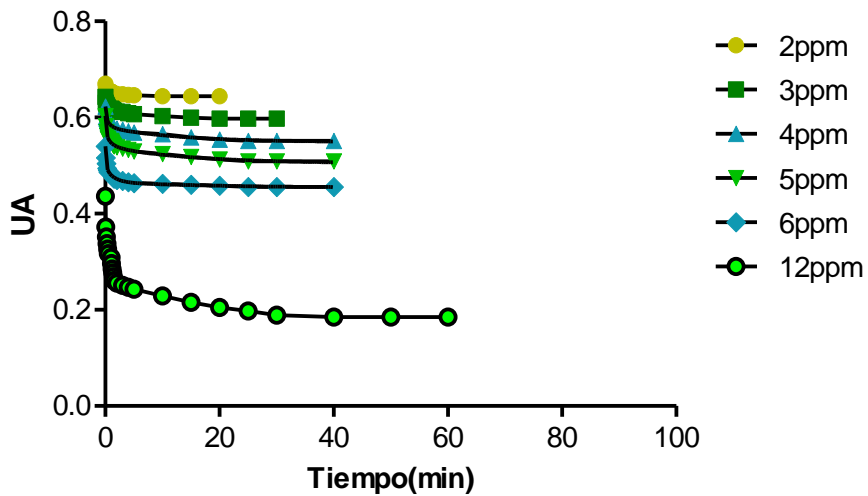
3F. Ecotipo 2



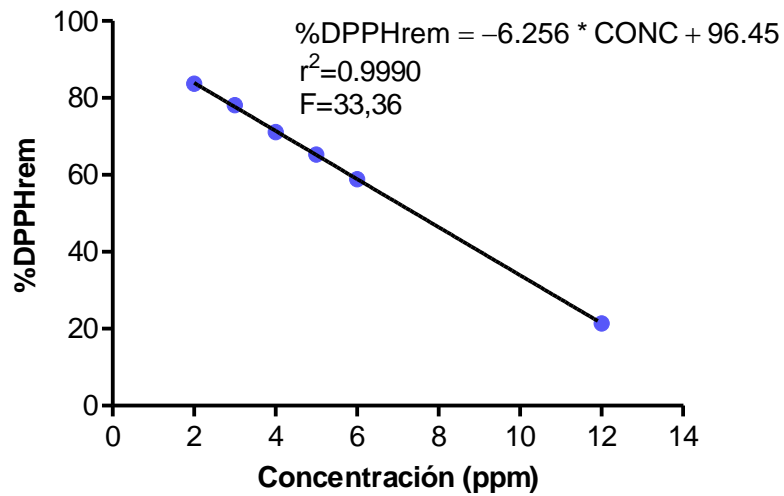
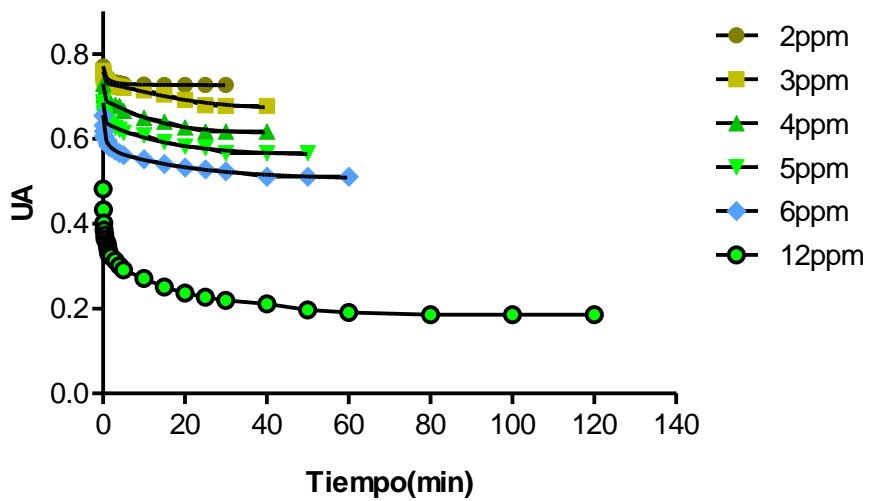
3G. Ecotipo 3



3H. Ecotipo 4



3l. Ecotipo 5



3J. Cinética de atrapamiento del radical DPPH para las concentraciones efectivas 50 (CE₅₀) de los extractos etanólicos (EET) de los ecotipos evaluados.

