

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



ESTUDIO DE LA ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE Y SURFACTANTE DE UN
EXTRACTO DE EPISPERMA DEL GRANO DE
CHENOPODIUM QUINOA WILD

Patrocinante:

Prof. María Eugenia Letelier M.
Laboratorio de Farmacología.
Departamento de Química
Farmacológica y Toxicológica.

Director de memoria:

Prof. María Eugenia Letelier M.
Laboratorio de Farmacología.
Departamento de Química
Farmacológica y Toxicológica.

Memoria de Título para optar al título de Químico Farmacéutico

CARMEN ANDREA RODRÍGUEZ ROJAS

SANTIAGO DE CHILE

2009

*No es necesario abarcar
tanto conocimiento, sino saber aplicarlo.
El optimismo y la perseverancia hacen que la vida
sea más que un dulce, un viaje con distintos destinos,
que al final llega al alma que ha aprendido y
crecido de sus errores como de sus virtudes.*

AGRADECIMIENTOS

Más que agradecer a mi familia, es sentirme orgullosa de los padres que tengo. Gracias a los valores y enseñanza que me han inculcado, que están en mí en cada momento y en cada problema. Gracias por su filosofía de vida, que han hecho en mí, ser una mujer con mucho optimismo y creer en mi misma, que con esfuerzo, humildad y perseverancia, las dificultades son pasajeras.

Agradecer a mis grandes amigos de la vida: Catalina, Tamara, Fernando y mi mejor amiga de la Universidad, Anita Besoáin. Por estar siempre conmigo en los buenos y en los malos momentos. Por tener paciencia, entenderme, compartir grandes momentos y enojarse conmigo. Simplemente gracias por su amistad incondicional y por ser mi segunda familia.

A Felipe, gracias por tu apoyo incondicional, amistad y amor, has sido muy importante para mí.

A mis amigos de la Universidad, Ivonne Flores, Jimena Canales, Vivi Muga, Neil Peña y Sebastián Sánchez, con quienes he vivido una de las etapas más importante y felices de mi vida, gracias por su apoyo, amistad y alegría. Los adoro.

No sé si tengo palabras para expresar mis sentimientos al laboratorio. Fue el mejor lugar donde pude realizar mi tesis. Prof. María Eugenia Letelier, simplemente gracias por creer en mí y enseñarme muchas cosas básicas, pero que son muy importantes, su gran cariño y por sus sabios consejos. Jose, Juan, Alfredo y Lili, gracias por enseñarme distintas cosas y por compartir grandes momentos. Paula y Andrea, gracias por su ayuda y su preocupación incondicional. Gracias a todos y somos un gran equipo multifuncional, los quiero mucho.

ABREVIATURAS

DTNB	: Ácido 5,5'-ditio- <i>bis</i> (2-nitrobenzoico)
MDA	: Malondialdehído
TBA	: Ácido 2-tiobarbitúrico
TBARS	: Sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico
TRIS	: Tri-hidroximetil-aminometano
TCA	: Ácido tricloroacético
DNB	: 1-Cloro-2,4-dinitrobenceno.

ÍNDICE GENERAL

	<i>Página</i>
DEDICATORIA.....	II
AGRADECIMIENTOS.....	III
ABREVIATURAS.....	IV
ÍNDICE GENERAL.....	V
ÍNDICE DE FIGURAS.....	VII
INDICE DE TABLAS.....	VII
RESUMEN.....	VIII
SUMMARY.....	IX
I. INTRODUCCIÓN.....	1
Hipótesis.....	5
Objetivos generales.....	5
Objetivos específicos.....	5
II. MATERIALES Y MÉTODOS.....	6
Reactivos.....	6
Animales de experimentación.....	7
Preparación de microsomas hepáticos de rata.....	8
Condiciones oxidativas.....	8
Lipoperoxidación microsómica.....	8
Determinación de tioles totales.....	9

Determinación de hemoglobina	9
Actividad GSH-transferásica microsómica.....	10
Determinación de las constantes cinéticas.....	11
Análisis estadístico.....	11
III. RESULTADOS.....	12
IV. DISCUSIÓN.....	30
V. CONCLUSIONES.....	30
VI. REFERENCIAS.....	36

ÍNDICE DE FIGURAS		Página
Figura 1	Efecto del extracto de quínoa sobre la Lipoperoxidación microsómica provocada por Cu ²⁺ /ascorbato	13
Figura 2	Efecto del extracto de quínoa sobre la pérdida de los tioles microsómicos provocada por Cu ²⁺ /ascorbato.	14
Figura 3	Efecto del extracto de quínoa sobre la liberación de Hemoglobina.	17
Figura 4	Efecto del extracto de quínoa sobre la lipoperoxidación microsómica basal.	18
Figura 5	Efecto de Tritón X-100 sobre la lipoperoxidación microsómica basal.	19
Figura 6	Efecto comparativo del extracto de quínoa y Tritón X-100 sobre la lipoperoxidación basal.	21
Figura 7	Efecto del extracto de quínoa sobre la actividad GSH-transferásica microsómica.	23
Figura 8	Efecto de Tritón-X100 sobre la actividad GSH-transferásica microsómica.	24
Figura 9	Efecto aditivo de Tritón 0,15% y extracto de quínoa sobre la actividad GSH-transferásica.	25
Figura 10	Efecto del extracto de quínoa sobre la activación de la GSH-transferasa provocada por H ₂ O ₂ .	29

INDICE DE TABLAS		Página
Tabla 1	GSH-transferásica microsómica: Parámetros cinéticos.	27

RESUMEN

Estudio de la actividad antioxidante y surfactante de un extracto de episperma del grano de *Chenopodium quinoa* Wild. El episperma del grano de *Chenopodium quinoa* Wild (quínoa) se comercializa como fuente de saponinas, dada a su alta concentración en este subproducto. Sin embargo, no existen antecedentes acerca de la presencia de principios antioxidantes en el episperma. Es por ello, que como una primera aproximación, se preparó un extracto de episperma en etanol al 30% para estudiar sus propiedades antioxidantes, utilizando para ello, microsomas hepáticos de rata, membranas biológicas susceptibles de sufrir cambios conformacionales por acción de detergentes y oxidación de sus componentes. Este extracto: a) inhibió la oxidación de los lípidos y los tioles microsómicos, ambos fenómenos inducidos por Cu^{2+} /ascorbato, sistema generador de EROs; b) produjo la liberación de hemoglobina desde eritrocitos; c) aumentó la lipoperoxidación basal microsómica, similar al efecto provocado por Tritón X-100; d) inhibió la actividad de la GSH-transferasa microsómica, enzima sensible a cambios en la fluidez de la membrana microsómica y a oxidación; sin embargo, en nuestras condiciones de ensayo, el detergente Tritón X-100, la aumentó. Los cambios en la actividad GSH-transferásica provocados por el extracto, se reflejaron en la modificación de la $V_{\text{máx}}$ y la K_m para GSH de esta enzima, no así en la K_m para el sustrato 1-CI-2,4-DNB. Estos resultados sugieren que el extracto estudiado no sólo es surfactante, sino además, posee propiedades antioxidantes.

ABSTRACT

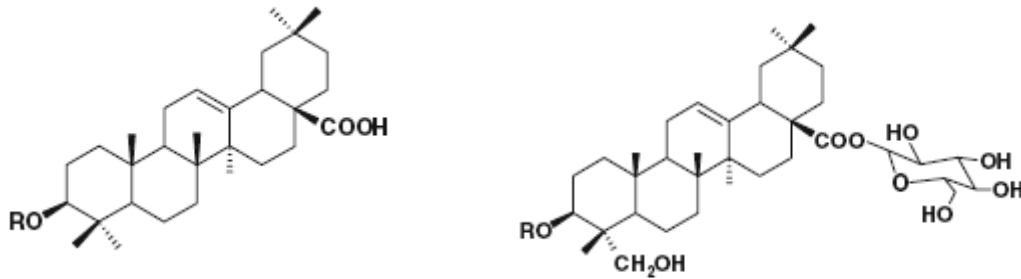
Study of the antioxidant and surfactant activities of an extract from the episperm of *Chenopodium quinoa* Wild grain. The episperm of the *Chenopodium quinoa* Wild (quinoa) grains is commercialized as a source of saponins, in virtue of their high concentration in this quinoa byproduct. There are no previous studies regarding the presence of antioxidant molecules in quinoa episperm. Therefore, as a first approximation, we studied the antioxidant and surfactant properties of a 30% ethanolic extract from quinoa episperm; to this end, we used rat liver microsomes, biological membranes susceptible to conformational changes by the action of detergents and oxidation of its components. This extract: a) inhibited oxidation of microsomal lipids and thiol groups elicited by Cu^{2+} /ascorbate, a ROS-generating system; b) elicited the release of hemoglobin from erythrocytes; c) increased basal lipid peroxidation, similar to the effect of Triton X-100; d) inhibited the activity of GSH-transferase, an enzyme sensitive to changes in the microsomal membrane fluidity and to oxidation; however, in our assay conditions, this activity was increased by Triton X-100. Changes in GSH-transferase activity caused by the extract were reflected in changes on the V_{max} of this activity, as well as the K_m for GSH but not for the substrate 1-Cl-2,4-DNB. These data suggest that the extract studied here not only displays surfactant activity, also antioxidant properties.

I. INTRODUCCIÓN

Chenopodium quinoa Wild pertenece a la familia *Chenopodiaceae*, es una planta dicotiledónea que crece en la región de los Andes y se encuentra entre 2500 a 4000 metros de altitud [1]. El grano de *Chenopodium quinoa* Wild (quínoa) contiene varias vitaminas en bajas concentraciones, por ejemplo ácido fólico, tiamina, ácido ascórbico y riboflavinias [2]. Además contiene minerales como calcio, hierro, zinc, cobre y manganeso. La semilla de la quínoa, especialmente el embrión, posee un alto contenido de aceites, entre los que se encuentran el ácido palmítico, oleico, linoleico y linolénico. También posee antioxidantes endógenos, como α - y γ -tocoferol [3, 4]. En la semilla de la quínoa se ha encontrado un alto contenido de proteínas, almidón y aminoácidos libres, tales como lisina, histidina y triptófano [5].

Los granos de quínoa presentan en su episperma contenidos variables de saponinas que oscilan entre 0,01-4,65% de su peso seco [6]. Las saponinas de la quínoa son glucósidos del tipo triterpenoide que se caracterizan por su sabor amargo, capacidad de formar espuma en soluciones acuosas y su poder hemolítico.

El mayor número de saponinas identificadas corresponden a monodesmósidos y bidesmósidos.



Estudios realizados con saponinas aisladas han mostrado que los monodesmósidos serían los responsables de la actividad surfactante que conlleva a hemólisis de glóbulos rojos [7]. Los monodesmósidos forman además, complejos con el colesterol y como consecuencia de esto, pueden disminuir niveles de colesterol en la sangre [8]. Por otra parte, se ha descrito que las saponinas pueden inducir cambios en la permeabilidad intestinal ayudando a la absorción de fármacos [9]. Así, se ha utilizado la administración por vía intranasal u oral de saponinas como coadyuvantes en vacunas, potenciando de esta manera la respuesta de anticuerpos IgG e IgA específicos, frente a antígenos presentes en el suero, secreciones pulmonares e intestinales. Esto se debe a un incremento de la permeabilidad de la mucosa y por lo tanto un aumento de la absorción del antígeno [10].

La característica común de los preparados herbales es su capacidad antioxidante, dada principalmente por su alta concentración de polifenoles.

Estos compuestos abundan principalmente en las partes de la planta más expuestas a la radiación solar, como son las hojas y pericarpio de los frutos.

Las especies reactivas del oxígeno (EROs) se generan en todas las células aeróbicas como segundos mensajeros y como subproductos del metabolismo en presencia del oxígeno [11]. Estas especies pueden generar estrés oxidativo en las células, si su generación no es controlada por la capacidad antioxidante celular [12] . Si las células se encuentran bajo un estrés oxidativo, las EROs pueden oxidar lípidos, proteínas y ácidos nucleicos, conduciendo finalmente a la muerte celular [13,14].

Las propiedades antioxidantes de los preparados naturales protegen a las biomoléculas frente al daño oxidativo, a través de diferentes mecanismos. Por ejemplo, algunos de estos compuestos pueden atrapar directamente a los radicales libres del oxígeno y quelar metales de transición, los cuales en su estado iónico libre pueden generar EROs vía reacción de Fenton/Haber-Weiss [15].

Las propiedades antioxidantes del episperma del grano de la quínoa no se conocen; más aún, no existen antecedentes acerca de la presencia en él de principios antioxidantes.

Dados los antecedentes mostrados, en este trabajo se preparó un extracto hidroalcohólico (alcohol al 30%) de episperma de grano de quínoa, con el

objeto de investigar su capacidad antioxidante. Para ello, se utilizó una preparación enriquecida en retículo endoplásmico hepático de rata (microsomas) como fuente de biomoléculas y, Cu^{2+} /ascorbato como sistema generador de EROs [14]. Como se mencionó anteriormente, los polifenoles son los principios antioxidantes más abundantes en las plantas. Interesantemente, el extracto ensayado contenía polifenoles, y además, compuestos tiólicos que son los principales antioxidantes de origen animal. Más aún, nuestro extracto fue capaz de inhibir la oxidación de los lípidos y de los tioles microsómicos, ambos fenómenos provocados por el sistema Cu^{2+} /ascorbato. Por otra parte, este extracto fue capaz de liberar hemoglobina desde una suspensión de glóbulos rojos, confirmando así la presencia de saponinas. Cabe señalar además, que cambios en la permeabilidad de membranas biológicas, puede alterar la función de las proteínas insertas en ella [16]. Como una forma de evaluar este fenómeno, se estudió el efecto del extracto sobre la actividad de la GSH-transferasa microsómica, la cual es alterada por cambios redox y conformacionales de dicha membrana. El extracto de episperma del grano de quínoa inhibió la actividad catalítica de esta enzima, cuya forma activa es el dímero -S-S- [17].

Estos resultados representan el primer estudio acerca de la actividad antioxidante de episperma del grano de quínoa. Más aún, son escasas las plantas medicinales que poseen agentes reductores tiólicos, de aquí la

importancia de continuar este estudio, dada las variadas funciones de estos compuestos en la célula animal.

HIPÓTESIS

El extracto hidroalcohólico de episperma del grano de *Chenopodium Quínoa* Wild presenta actividad antioxidante de biomoléculas además de su actividad surfactante previamente descrita.

OBJETIVOS

Objetivo general

Estudiar la capacidad antioxidante del extracto hidroalcohólico de episperma del grano de *Chenopodium Quínoa Wild* (Quínoa), como también su capacidad surfactante.

Objetivos específicos

A. Actividad antioxidante

- Determinar la concentración de polifenoles presentes en el extracto de episperma del grano de quínoa.
- Evaluar la lipoperoxidación microsómica inducida por Cu^{+2} /ascorbato en ausencia y presencia del extracto de episperma del grano de quínoa.

- Determinar el contenido de lípidos de la membrana microsómica en condiciones de estrés oxidativo, en ausencia y presencia del extracto de quínoa.

B. Cambios conformacionales de membranas biológicas.

- Evaluar el efecto del extracto de quínoa y Tritón X-100 sobre la lipoperoxidación microsómica basal.
- Medir la liberación de hemoglobina desde una suspensión de glóbulos rojos en presencia del extracto de quínoa y Tritón X-100.
- Determinar el efecto del extracto de quínoa, Tritón X-100, DTT y H₂O₂ sobre las constantes cinéticas de la GSH-transferasa.

II. MATERIALES Y MÉTODOS

A. MATERIALES

1. Reactivos. BSA, CuSO₄, Catequina [(+)-cianidol-3,(2*R*,3*S*)-2-(3,4-dihidroxifenil)-3,4-dihidro-1(2*H*)-benzopiran-3,5,7-triol], reactivo de Folin-Ciocalteu, ascorbato de sodio, ácido 5,5'-ditio-*bis*(2-nitrobenzoico) (DTNB), 1-cloro-2,4-dinitrobenzoceno, ditiotreitól (DTT) y GSH se obtuvieron de Sigma-Aldrich. El resto de los reactivos utilizados fueron del mejor grado analítico.

El extracto hidroalcohólico de episperma del grano de quínoa fue donado por Laboratorios Ximena Polanco (Santiago, Chile). Este extracto fue preparado

utilizando como solvente de extracción etanol al 30%. Dada la reconocida actividad antioxidante de los preparados herbales, se determinó el contenido de polifenoles totales de acuerdo al método descrito en Letelier y cols., 2008 [19], utilizando catequina [(+)-cianidol-3,(2*R*,3*S*)-2-(3,4-dihidroxifenil)-3,4-dihidro-1(2*H*)-benzopiran-3,5,7-triol] como estándar. La concentración de polifenoles totales del extracto fue $9,0 \pm 0,33\mu\text{moles}$ equivalentes de catequina/mL de extracto.

Las muestras de sangre se obtuvieron por punción venosa de alumnos voluntarios, tesistas del Laboratorio.

2. Animales de experimentación. Se emplearon ratas machos de la cepa Sprague Dawley (200 a 230 g), mantenidas en el vivero de la Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas de la Universidad de Chile. Los animales se mantuvieron con una dieta normal de pellet Kimber, agua *ad libitum*, ciclos de luz y oscuridad (07:00 a 19:00hr), y a una temperatura ambiental de 22° C. Todos los procedimientos se desarrollaron de acuerdo a los protocolos aprobados por el Comité de Ética de la Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas de la Universidad de Chile que considera los protocolos internacionales de la Guía para el cuidado y uso de animales de laboratorio.

B. MÉTODOS

- 1. Preparación de microsomas hepáticos de rata.** La fracción microsómica fue preparada por centrifugación diferencial. La determinación de proteína de la fracción microsómica se desarrolló de acuerdo a Lowry y cols., 1951 [18], usando BSA como estándar.
- 2. Condiciones oxidativas.** Los microsomas (1mg proteína/mL) fueron incubados con CuSO_4 25nM y ascorbato de sodio 1mM a 37°C durante 20min en los ensayos de lipoperoxidación microsómica y 1hr, en las determinaciones de tioles microsómicos.
- 3. Lipoperoxidación microsómica.** La lipoperoxidación microsómica inducida por el sistema Cu^{2+} /ascorbato se estimó midiendo las sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico (TBARS) de acuerdo al método descrito en Letelier y cols., 2005 [19]. El efecto del episperma del grano de quínoa sobre la lipoperoxidación se determinó incubando los microsomas (1mg proteína/mL) en ausencia o presencia del extracto durante 5 min a 25°C, antes de incubar las mezclas con el sistema Cu^{2+} /ascorbato. El malondialdehído, producto de la descomposición de los lipoperóxidos formados, reacciona con el ácido tiobarbitúrico dando lugar a un conjugado el cual posee una absorbancia máxima a 532nm y cuyo coeficiente de extinción es $156\text{mM}^{-1} \times \text{cm}^{-1}$.

De la misma forma se determinó la lipoperoxidación basal, la única excepción fue que en este caso no se adicionó a la mezcla de reacción Cu^{2+} /ascorbato.

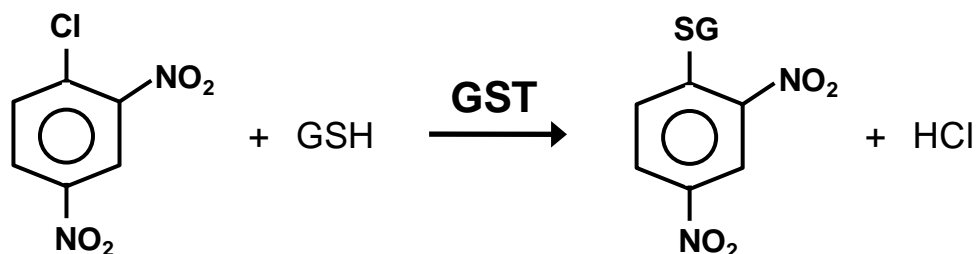
Dado que el extracto se obtuvo utilizando como solvente una solución de alcohol al 30%, se realizaron controles para descartar el efecto del solvente de extracción sobre la lipoperoxidación inducida y basal. Ninguno de los volúmenes de solvente, equivalentes a aquellos del extracto ensayados, modificaron la lipoperoxidación inducida ni basal.

4. Determinación de tioles totales: La medición de los tioles totales se realizó de acuerdo a la técnica descrita en Letelier y cols., 2009 [20]. Esta técnica cuantifica espectrofotométricamente el TNB liberado en la reacción entre el DTNB y los grupos sulfhidrilos presentes en la muestra. Previo a la determinación de los tioles microsómicos, se confirmó el pico de absorbancia máxima del TNB, producto de la reacción entre el DTNB y los tioles presentes en la muestra. En nuestras condiciones de ensayo, el pico de absorbancia máxima se obtuvo a 420nm. Con este antecedente se determinó el coeficiente de extinción molar $\epsilon_{420\text{nm}} = 10,75\text{mM}^{-1} \times \text{cm}^{-1}$, utilizando para ello, una solución de GSH.

5. Determinación de hemoglobina. Los eritrocitos fueron aislados de sangre humana mediante gradiente de Ficoll [21] y lavados con 20 volúmenes de PBS frío x 3 veces (1000 x g por 10min at 4°C). Los eritrocitos sedimentados

fueron resuspendidos a $1,5 \times 10^6$ células/mL. Estas suspensiones de 1 mL de glóbulos rojos fueron incubadas con o sin cantidades crecientes del extracto de quínoa (hasta $40\mu\text{L}$) por 15min a 4°C . Luego, las muestras se centrifugaron a $1000 \times g$ por 10min at 4°C y se determinó la absorbancia de los sobrenadantes a 550nm. El contenido de hemoglobina fue calculado utilizando el $\epsilon_{550} = 53.412 \text{ M}^{-1} \times \text{cm}^{-1}$ [22].

6. Actividad GSH-transferásica microsómica. La conjugación de 1-cloro-2,4-dinitrobenzeno con GSH, reacción catalizada por la GSH-transferasa (GST) se ensayó de acuerdo al método descrito en Letelier y cols., 2005 [23]. La ecuación química es la siguiente:



La mezcla de reacción contenía (concentraciones finales) en un volumen de 1 mL: amortiguador fosfato 0,1M pH 6,5; 1-cloro-2,4-dinitrobenzeno 1mM; GSH 4mM; proteína microsómica 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$. El blanco contenía todos los reactivos, a excepción del GSH. La reacción se inició agregando el GSH a la cubeta muestra. La actividad se determinó midiendo la absorbancia del conjugado formado enzimáticamente a 340 nm, en forma continua durante 3

min a 25°C, con el objeto de minimizar la reacción no enzimática. La aparición del conjugado se midió en forma continua, a 340nm en un espectrofotómetro UV-VIS-UNICAM UV3. La actividad de la GST se calculó utilizando el $\epsilon_{340} = 9,6\text{mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ del conjugado. Los datos se expresaron como $\mu\text{mol conjugado}/\text{min}/\text{mg}$ de proteína.

7. Determinación de las constantes cinéticas. Los valores de K_m y $V_{\text{máx}}$ para la conjugación de 1-Cl-2,4-DNB con GSH, se obtuvieron al graficar los valores experimentales de velocidad vs concentración de sustrato de acuerdo a Lineweaver-Burk. En este gráfico, el intercepto del eje x representa el valor recíproco negativo de la K_m y el del eje y, el recíproco de la $V_{\text{máx}}$.

8. Análisis estadístico. Los datos presentados corresponden al promedio de al menos 4 experimentos independientes \pm SD. La significancia estadística (ANOVA) y los análisis de regresión se desarrollaron usando el software GraphPad Prism 5.0. Las diferencias se consideraron como significativas, cuando $p < 0.05$.

III.RESULTADOS

A. Actividad antioxidante.

A.1. Lipoperoxidación microsómica: La Figura 1 muestra el gráfico semilogarítmico de la concentración de extracto *versus* el % de inhibición de la lipoperoxidación microsómica evaluada de acuerdo a lo descrito en Métodos. A partir de este gráfico se calculó el valor de EC₅₀; su valor fue 16,85µL de extracto/mg de proteína, el cual representa la concentración de extracto que inhibe el 50% de la lipoperoxidación microsómica inducida por Cu²⁺/ascorbato. El valor de r = 0,9808 fue obtenido del análisis de regresión de la curva.

A.2. Oxidación de tioles microsómicos. El extracto de episperma del grano de quínoa previno la disminución de los tioles microsómicos inducida por Cu²⁺/ascorbato (Figura 2); 10µL del extracto/mg de proteína microsómica previnieron esta disminución aproximadamente en un 50%, y 20µL, 100%, indicando que el efecto protector de los tioles microsómicos es directamente proporcional a la concentración de extracto.

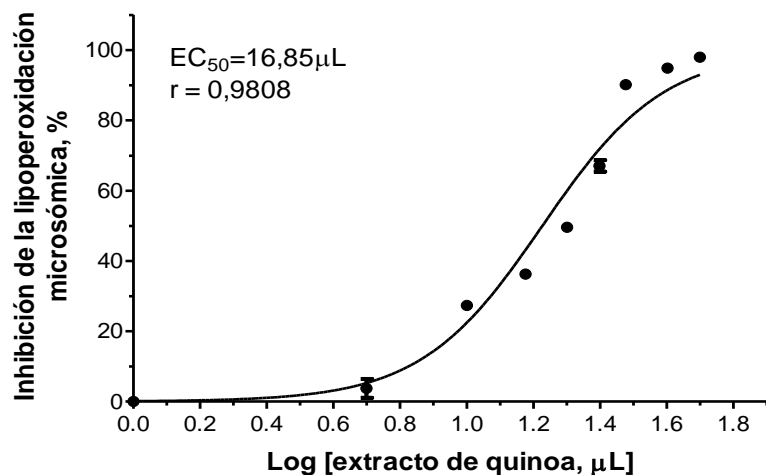


Figura 1. Efecto del extracto de quínoa sobre la Lipoperoxidación microsómica provocada por Cu²⁺/ascorbato. Los microsomas (1mg de proteína/mL) fueron incubados con el extracto durante 5min a 25°C, antes de inducir la lipoperoxidación con Cu²⁺/ascorbato de acuerdo a lo descrito en Métodos. Los porcentajes de inhibición fueron calculados considerando como 100% el valor de la lipoperoxidación inducida por Cu²⁺/ascorbato en ausencia del extracto. Cada valor representa el promedio de al menos 4 experimentos independientes ± S.D.

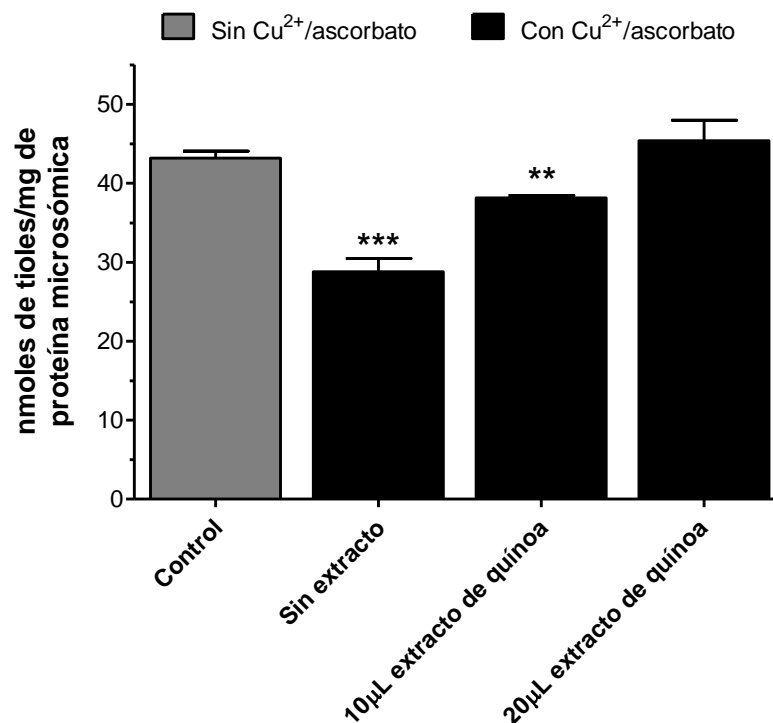


Figura 2. Efecto del extracto de quínoa sobre la pérdida de los tioles microsómicos provocada por Cu²⁺/ascorbato. Los microsomas (1mg de proteína/mL) fueron incubados con el extracto durante 10min a 37°C antes de agregar Cu²⁺/ascorbato y desarrollar la lipoperoxidación de acuerdo a lo descrito en Métodos. El control corresponde al contenido total de tioles microsómicos en ausencia de Cu²⁺/ascorbato y las barras negras, al obtenido en presencia de este sistema prooxidante. Cada valor representa el promedio de al menos 4 experimentos independientes ± S.D. **p<0,01 y ***p<0,001: Valores estadísticamente diferentes del valor Control ensayado en ausencia de Cu²⁺/ascorbato.

B. Cambios conformacionales de membranas biológicas. Los cambios conformacionales de las membranas biológicas pueden ser ocasionados por agentes físicos y/o químicos. Si el cambio es provocado por la actividad detergente del extracto de quínoa o Tritón X-100, se afecta la conformación de los lípidos de membrana y como consecuencia la conformación de las proteínas insertas en ella. Es por ello que como una medida de los cambios conformacionales de membrana, se estudió el efecto del extracto y de Tritón X-100 sobre la liberación de hemoglobina desde una suspensión de glóbulos rojos y sobre la lipoperoxidación microsómica basal.

B.1. Efecto provocado por el extracto de quínoa y Tritón X-100 sobre la liberación de hemoglobina de glóbulos rojos. Como una forma de corroborar el efecto del extracto de quínoa en estudio sobre membranas biológicas, se ensayó su efecto sobre la liberación de hemoglobina de glóbulos rojos. Contrariamente a lo esperado, en nuestras condiciones de ensayo (Ver Métodos) el extracto fue capaz de alterar la membrana de los glóbulos rojos, liberando hemoglobina de una forma concentración - respuesta (Figura 3), confirmando así el efecto surfactante de este extracto. El análisis estadístico de los resultados mostró un valor de EC_{50} igual a $30\mu\text{L}$ y un coeficiente de regresión igual a 0,9996.

B.2. Cambios en la Lipoperoxidación microsómica basal provocados por el extracto de quínoa. El extracto de quínoa alteró la lipoperoxidación microsómica basal de un forma bimodal (Figura 4). Así, bajas concentraciones del extracto (0,025 μ L - 5 μ L/mg de proteína microsómica) aumentaron aproximadamente 1,4 veces la lipoperoxidación basal, aumento que se mantuvo constante hasta 15 μ L de extracto. Mayores concentraciones del extracto sin embargo, (15 μ L - 50 μ L/mg de proteína microsómica) inhibieron progresivamente este fenómeno oxidativo. El análisis de regresión de los datos correspondientes a la activación de la lipoperoxidación basal mostró un EC₅₀ igual a 2,1 μ L ($r = 0,9920$).

B.3. Efecto de Tritón X-100 sobre la lipoperoxidación microsómica basal.

Tritón X-100 es un detergente, por lo tanto podría aumentar la lipoperoxidación microsómica basal. Sin embargo como no se comporta como antioxidante, ejercería sólo su acción detergente. Al ensayar este efecto de Tritón X-100 se observó un efecto bimodal semejante al extracto de quínoa (Figura 5). Las concentraciones de Tritón X-100 que significativamente aumentaron la lipoperoxidación basal fueron 0,05; 0,1; 0,15%V/V, las cuales activaron este fenómeno oxidativo aproximadamente 18%, 13% y 9% respectivamente ($p < 0,01$); mayores concentraciones de este detergente (0,2% - 0,4% - 0,5%), no lo modificaron ($p < 0,01$).

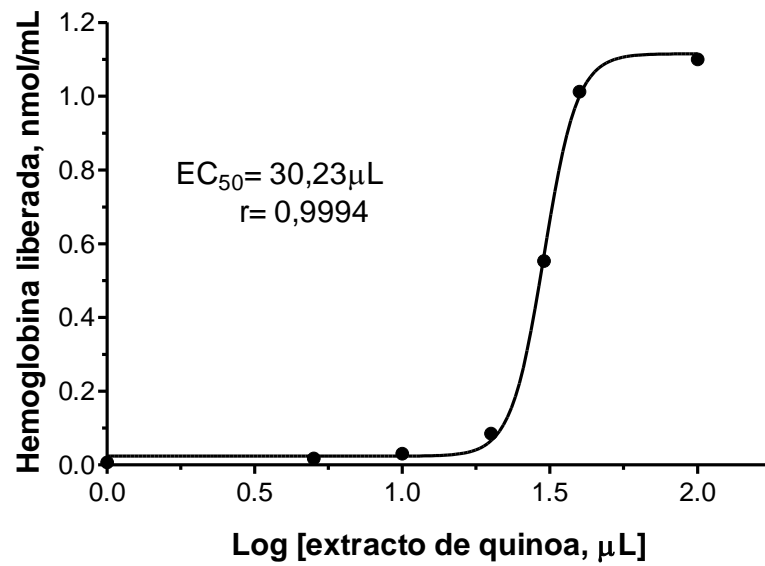


Figura 3. Efecto del extracto de quínoa sobre la liberación de Hemoglobina. Los eritrocitos se centrifugaron en presencia y ausencia del extracto de quínoa (hasta 40μL), a 2000 rpm durante 10min. La cantidad mínima de hemoglobina liberada corresponde a la muestra en ausencia del extracto. Tritón 0,15% produjo liberación total de hemoglobina.

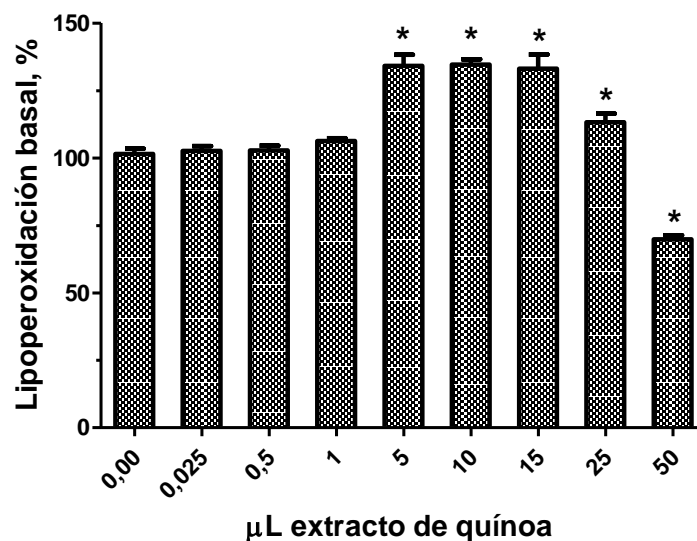


Figura 4. Efecto del extracto de quínoa sobre la lipoperoxidación microsómica basal. Los microsomas (1mg de proteína/mL) fueron incubados con el extracto durante 20min a 25°C. Los porcentajes de inhibición fueron calculados considerando como 100% el valor de la lipoperoxidación microsómica en ausencia del extracto. Cada valor representa el promedio de al menos 4 experimentos independientes \pm S.D. * $p < 0,001$: Valores estadísticamente diferentes comparados con la lipoperoxidación basal medida en ausencia del extracto de quínoa.

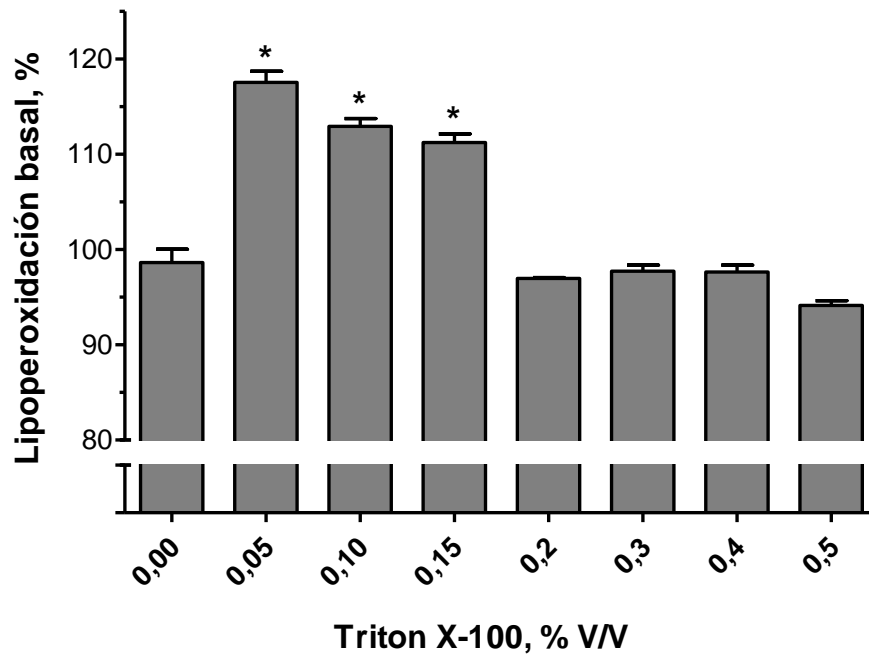


Figura 5. Efecto de Tritón X-100 sobre la lipoperoxidación microsómica basal. Los microsomas (1mg de proteína/mL) fueron incubados a distintas concentraciones de Tritón X-100 (0,05%-0,5%) durante 20min a 25°C. Los porcentajes de inhibición fueron calculados considerando como 100% el valor de la lipoperoxidación microsómica en ausencia de Tritón X-100. Cada valor representa el promedio de al menos 4 experimentos independientes \pm S.D. * $p < 0,001$: Valores estadísticamente diferentes comparados con la lipoperoxidación basal medida en ausencia de Tritón X-100.

B.4. Efecto comparativo del extracto de quínoa y Tritón X-100 sobre la lipoperoxidación microsómica basal. Si el efecto tanto del extracto de quínoa como Tritón X-100 sobre la lipoperoxidación microsómica basal son provocados por el efecto detergente de ambos, al colocar ambos compuestos en la mezcla de reacción el efecto total sobre la lipoperoxidación, debería ser la sumatoria de ambos. Para ello, se probaron 5µL del extracto de quínoa/mg de proteína microsómica y 0,15%V/V de Tritón X-100/mg de proteína microsómica, condiciones en las cuales ambos provocaron aumento de la lipoperoxidación basal. Interesantemente, la mezcla de extracto de quínoa y Tritón X-100 no modificó la lipoperoxidación basal (Control), indicando la anulación de ambos efectos individuales que mostraban aumento de este fenómeno oxidativo (Figura 6).

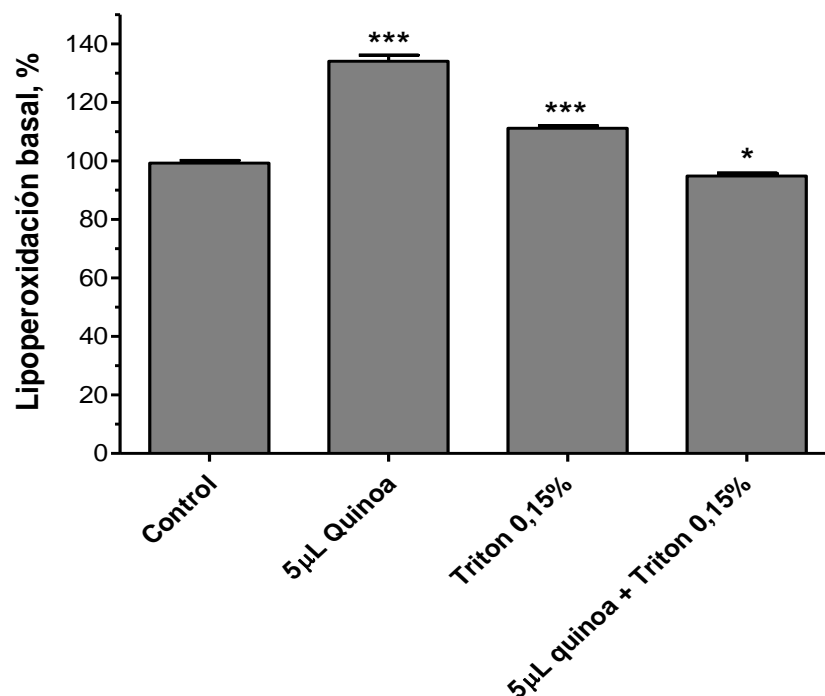


Figura 6. Comparación del efecto de quínoa y Tritón X-100 sobre la lipoperoxidación basal. Los microsomas (1mg de proteína/mL) fueron incubados en presencia de 5μL de quínoa y/o Tritón 0,15% durante 20min a 25°C. Los porcentajes de inhibición fueron calculados considerando como 100% el valor de la lipoperoxidación microsómica en ausencia de Tritón X-100. Cada valor representa el promedio de al menos 4 experimentos independientes \pm S.D. * $p < 0,05$ y *** $p < 0,001$: Valores estadísticamente diferentes comparados con la lipoperoxidación basal ensayada en ausencia del extracto de quínoa y Tritón X-100.

C. Actividad GSH-transferásica (GST). Como se mencionó en la introducción, los cambios provocados por el extracto de episperma del grano de quínoa sobre la conformación de la membrana microsómica, pueden provocar alteraciones en la función de las proteínas insertas en ella, entre ellas, la GSH-transferasa.

C.1. Actividad GST en presencia del extracto de quínoa. Como se observa en la Figura 7 el extracto de episperma del grano de quínoa, en el rango de concentración (1 a 100 μ L/0,2 mg de proteína microsómica), inhibió la actividad GSH-transferásica microsómica, de una forma concentración - respuesta. El análisis de regresión de la curva obtenida dio un valor de EC₅₀ igual a 6,5 μ L y un valor de $r = 0,9911$.

C.2. Efecto de Tritón X-100 sobre la actividad GSH transferásica microsómica. Como se mencionó en la Introducción, se ha descrito la presencia de saponinas en el episperma del grano de la quínoa. Estos compuestos serían los responsables de la actividad surfactante de este extracto. Es por ello, que como una forma de corroborar este efecto, se utilizó Tritón X-100 como surfactante para comparar el efecto del extracto sobre la actividad GSH-transferásica. Contrariamente al efecto desarrollado por el extracto, Tritón X-100 activó la GSH-transferasa de una forma concentración- respuesta, alcanzándose un máximo de 2 veces la actividad control a la concentración 0,3% de este detergente. La incubación de los microsomas (0,2

mg de proteína microsómica/mL) con mayores concentraciones de Tritón X-100 sin embargo, disminuyó progresivamente esta activación; por ejemplo, la activación de la GSH-transferasa provocada por 0,5%V/V de Tritón X-100 fue aproximadamente de sólo 1,7 veces (Figura 8).

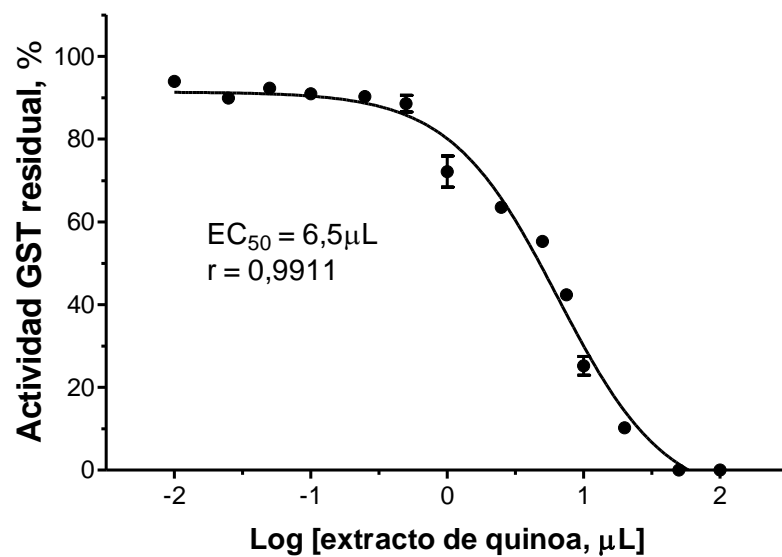


Figura 7. Efecto del extracto de quínoa sobre la actividad GSH-transferásica microsómica. [Microsomas]: 0,2mg de proteína/mL; GSH 4mM; DNB 1mM. Los porcentajes de actividad residual se calcularon considerando como 100% la actividad control, medida en ausencia del extracto. Los valores corresponden al promedio de 4 determinaciones independientes \pm S.D.

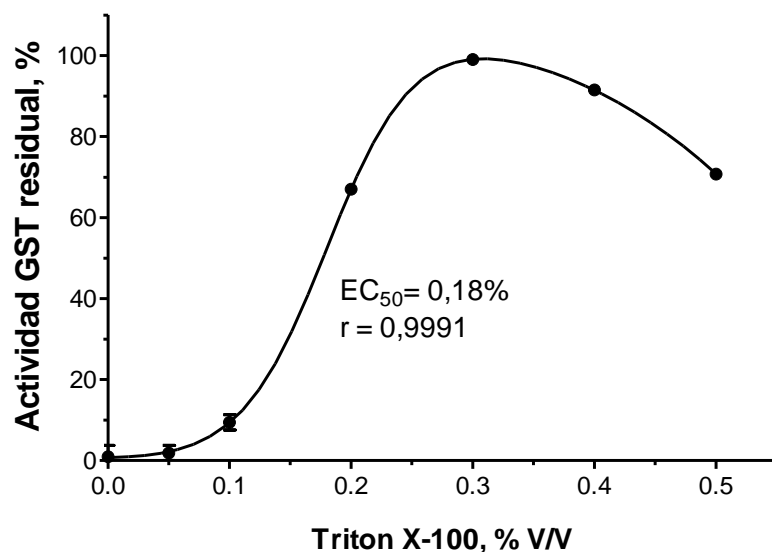


Figura 8. Efecto de Tritón X-100 sobre la actividad GSH-transferásica microsómica. Los microsomas (0,2mg de proteína/mL) fueron incubados con las distintas concentraciones de Tritón X-100 durante 5min a 25 °C antes de determinar la actividad GSH-transferásica de acuerdo a lo descrito en Métodos. Los valores corresponden al promedio de 4 determinaciones independientes \pm S.D.

C.3. Efecto de la mezcla de extracto de quínoa y Tritón X-100 sobre la actividad GSH-transferásica. La incubación de los microsomas con el extracto de quínoa (5 μ L) inhibió aproximadamente 40% la actividad GSH-transferásica. Tritón X-100 (0,15%) sin embargo, activó en un 30% esta actividad enzimática. La incubación de los microsomas con la mezcla de extracto de quínoa y Tritón X-100 produjo una inhibición de la actividad GSH-transferásica igual al 10%, indicando que ambos efectos (inhibidor del extracto y activador del Tritón X-100) fueron aditivos (Figura 9).

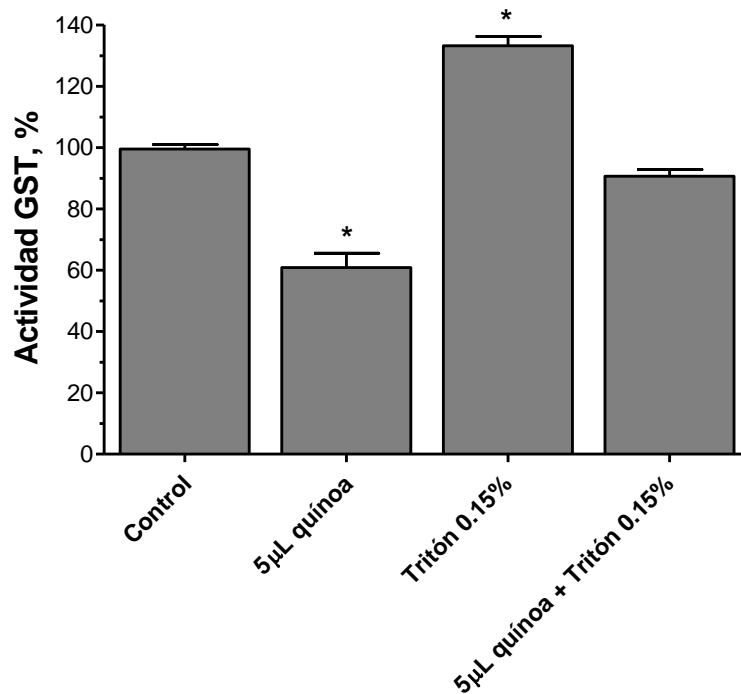


Figura 9. Efecto aditivo de Tritón 0,15% y extracto de quínoa sobre la actividad GSH-transferásica. Los microsomas (0,2mg de proteína/mL) fueron incubados en presencia de 5ul del extracto de quínoa y/o Tritón 0,15% durante 5min a 25°C antes de determinar la actividad GSH-transferásica de acuerdo a lo descrito en Métodos. Se consideró como 100% la actividad control en ausencia del extracto de quínoa y Tritón X-100 0,15%. Los valores corresponden al promedio de 4 determinaciones independientes \pm S.D. * $p < 0,01$: Vlores estadísticamente diferentes comparados con aquellos de la actividad GSH-transferásica medida en ausencia del extracto de quínoa y Tritón X-100.

C.4. Constantes cinéticas de la GSH-transferasa microsómica. Todos los agentes estudiados disminuyeron la $V_{m\acute{a}x}$ de la GSH-transferasa para conjugar 1-Cl-2,4-DNB con GSH: el extracto de quínoa (5 μ L), 35%; el extracto de quínoa (5 μ L) más Tritón X-100 (0,15%V/V) y DTT 4mM, aproximadamente 20%; la única excepción fue Tritón X-100 (0,15%V/V) que aumentó este parámetro cinético aproximadamente en un 40%. Por otra parte, la K_m para GSH fue modificada por todos los agentes ensayados, pero en distinta extensión. Así, el extracto de quínoa (5 μ L/0,2mg de proteína microsómica) la aumentó aproximadamente un 30%, Tritón X-100 (0,15%) la disminuyó en un 17%; el extracto de quínoa (5 μ L) más Tritón X-100 (0,15%) la aumentó aproximadamente 2,5 veces y DTT 4mM la aumentó aproximadamente 30%. La K_m para 1-Cl-2,4-DNB sin embargo, no fue significativamente modificada por ninguna de los agentes ensayados ($p < 0,05$).

CONSTANTES CINÉTICAS: Km y V_{máx}.

Condiciones	Km (mM)	V _{máx} nmoles de conjugado/min/mg de proteína microsómica
Control		
GSH	0,46 ± 0,004	67,8
1-CI-2,4-DNB	0,11 ± 0,005	65,4
+ Extracto quínoa (5µL)		
GSH	0,89 ± 0,009 *	43,9
1-CI-2,4-DNB	0,11 ± 0,003	44,4
+Tritón X-100 (0,15%)		
GSH	0,38 ± 0,004 *	96,5
1-CI-2,4-DNB	0,12 ± 0,009	91,6
+ Extracto quínoa (5µL) y Tritón X-100 (0,15%)		
GSH	1,12 ± 0,011 *	52,2
1-CI-2,4-DNB	0,12 ± 0,006	53,5
+ DTT (4 mM)		
GSH	0,59 ± 0,004 *	54,9
1-CI-2,4-DNB	0,13 ± 0,009	50,1

Tabla 1. Constantes cinéticas de la GSH-transferasa microsómica. Los microsomas (0,2mg de proteína/mL) fueron incubados a 25 °C con 5µL del extracto de quínoa y/o Tritón 0,15% por 5min y con DTT 4mM, 20min, antes de determinar la actividad enzimática. Los valores de Km y V_{máx} fueron obtenidos de los gráficos de Lineweaver-Burk. Cada valor representa el promedio de al menos 4 experimentos independientes ± S.D. *p<0,05 comparado con la Km control para GSH.

C.5. Efecto del extracto sobre la activación de la GSH-transferasa inducida por H₂O₂. En nuestras condiciones de ensayo, el H₂O₂ activó la GSH-transferasa aproximadamente en un 30%; el extracto de quínoa (5μL) en cambio, inhibió la actividad de esta enzima en un 45%. Al incubar los microsomas con el extracto, antes y después de adicionar H₂O₂ (protección y reversión, respectivamente), para luego determinar la actividad GSH-transferásica, no se observaron diferencias significativas respecto de la actividad residual medida en presencia del extracto sólo (45% de inhibición), p>0,05.

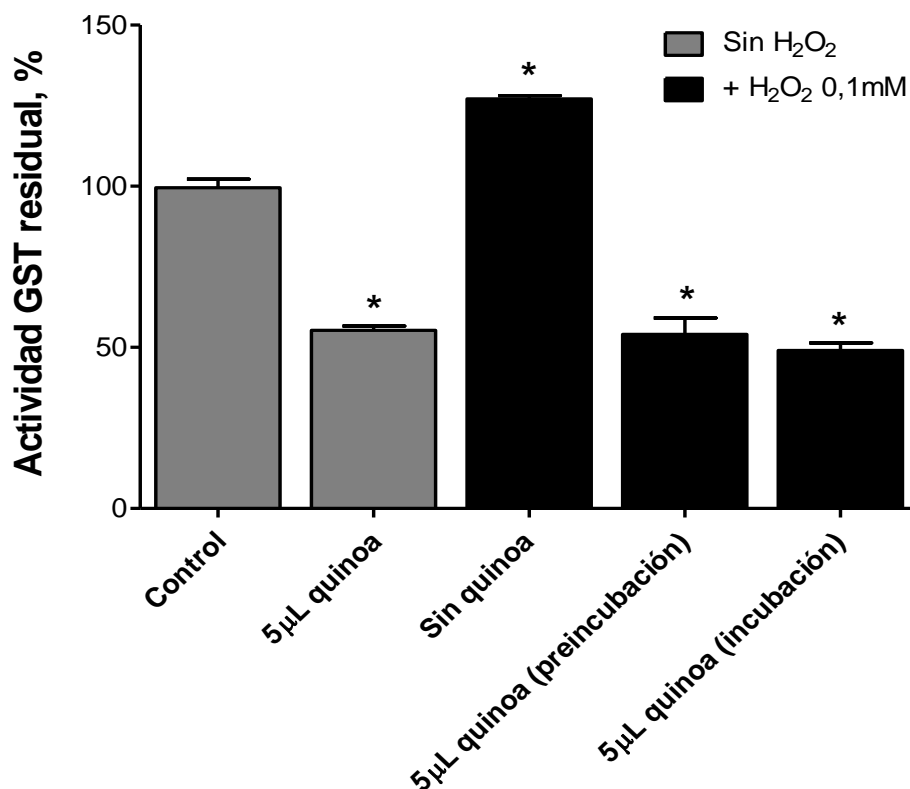


Figura 10. Efecto del extracto de quínoa sobre la activación de la GSH-transferasa provocada por H₂O₂. Los microsomas (0,2mg de proteína/mL) fueron incubados H₂O₂ 0,1mM durante 30min a 37°C antes de determinar la actividad enzimática de acuerdo a lo descrito en Métodos. Los ensayos con el extracto fueron realizados incubando las mezclas durante 5min con 5µL del extracto de quínoa durante 5min a 25°C, antes o después del tratamiento con H₂O₂. Cada valor representa el promedio de al menos 4 experimentos independientes ± S.D. * p<0,001: Valores estadísticamente diferentes al valor de la actividad GSH-transferásica control ensayada en ausencia de extracto de quínoa y H₂O₂.

IV. DISCUSIÓN

Dado que no existen antecedentes acerca de la presencia en el episperma del grano de quínoa, en este trabajo se evaluó la presencia de principios antioxidantes y la capacidad antioxidante de un extracto de episperma del grano de la quínoa. Sin embargo, los extractos de episperma de quínoa han sido caracterizados por la presencia de saponinas (monodesmósidos y bidesmósidos) [6]. Es por ello que en este trabajo se evaluó no sólo su actividad antioxidante sino también, su actividad surfactante.

Para probar la capacidad antioxidante del extracto, utilizamos una preparación enriquecida en retículo endoplásmico hepático de ratas (microsomas), organelo subcelular donde ocurre mayoritariamente la biotransformación de fármacos. Como agente oxidante, se utilizó Cu^{2+} /ascorbato, sistema generador de radicales libres del oxígeno. El extracto previno la oxidación de los lípidos y de los tioles microsómicos (figuras 1 y 2), confirmando así la hipótesis de nuestro trabajo que afirma que el extracto ensayado posee actividad antioxidante. Más aún, ambos fenómenos podrían deberse a la presencia de polifenoles, compuestos de reconocida actividad antioxidante [24], ya que se determinó la presencia de polifenoles totales en el extracto. Es interesante destacar que además de la presencia de polifenoles, este extracto contiene compuestos tiólicos medidos por el método del DTNB descrito en Métodos ($1,94 \pm 0,10 \mu\text{moles/mL}$ de extracto; datos no mostrados anteriormente). Los compuestos tiólicos también actúan como antioxidantes y probablemente

asemejarían mejor la actividad redox de los compuestos tiólicos presentes en la célula animal, como por ejemplo GSH, cisteína y tioles proteicos. Antioxidantes biológicos se define como sustancias que a concentraciones relativamente bajas son capaces de competir con sustratos oxidables y disminuir o inhibir significativamente la oxidación de estos sustratos. Esta definición incluye las enzimas superóxido dismutasa (SOD), GSH-peroxidasa (GPx) y catalasa, también como compuestos no enzimáticos tales como α -tocoferol, β -caroteno, ascorbato (Vitamina C) y GSH [25-26]. Estos agentes antioxidantes pueden sufrir reciclaje redox en la célula, lo cual incide en su eficiencia como antioxidantes de moléculas biológicas [27-28]. Los fenoles en cambio, al actuar como antioxidantes se convierten en quinonas, proceso que a nivel celular no es reversible. Más aún, existen diversos estudios que muestran que la toxicidad de algunos flavonoides se debe precisamente a la acción de quinonas, metabolitos intermediarios electrofílicos que pueden unirse covalentemente a macromoléculas como el DNA [29].

Por otra parte, el EC_{50} de la actividad antilipoperoxidante del extracto de quínoa fue mayor que el EC_{50} obtenido al estudiar la prevención de la oxidación de tioles microsómicos (figuras 1 y 2). Esto sugiere que la actividad antioxidante del extracto sobre los componentes de la membrana microsómica, favorecería la protección de los tioles de dicha membrana. Más aún, residuos de cisteína están involucrados en la función biológica de numerosas proteínas [30] y este extracto podría proteger su actividad biológica de la oxidación a través de las

EROs. A modo de ejemplo, datos del laboratorio muestran que un extracto hidroalcohólico de matico, presentan un EC_{50} para prevenir la oxidación de lípidos menor que para prevenir la oxidación de los tioles microsómicos [31], y este extracto no contiene compuestos tiólicos detectables por el método del DTNB que fue el utilizado en este trabajo.

Para evaluar la actividad surfactante del extracto de quínoa, se probó la capacidad del extracto de liberar la hemoglobina desde una suspensión de eritrocito, y se comparó dicho efecto con el efecto provocado por el detergente Tritón X-100. El extracto de quínoa produjo la liberación de hemoglobina desde una suspensión de eritrocitos de un modo concentración-respuesta similar al efecto de Tritón X-100 utilizado como control positivo (figura 3). Asimismo, el extracto de quínoa aumentó la lipoperoxidación basal, de forma similar al aumento producido por Tritón X-100 (figura 4 y 5). Sin embargo, volúmenes mayores a 15 μ L del extracto produjeron una disminución de la lipoperoxidación basal. Probablemente, en las condiciones ensayadas a concentraciones mayores a 15 μ L del extracto/mg de proteína microsómica, el efecto antioxidante de este extracto prevalece por sobre su efecto surfactante. Cabe señalar que el EC_{50} de la actividad antioxidante del extracto de quínoa respecto de la lipoperoxidación inducida por Cu^{2+} /ascorbato fue 16,9 μ L/mg de proteína microsómica (figura 1), lo cual apoya este postulado. Más aún, el aumento de la lipoperoxidación basal provocado por el extracto de quínoa (5 μ L) y por Tritón X-100 0,15%V/V sobre la lipoperoxidación basal, fue anulado totalmente al

incubar los microsomas con la mezcla del extracto y dicho detergente (figura 6), sugiriendo nuevamente que en la mezcla el efecto antioxidante del extracto prevalece sobre la actividad surfactante.

Como se mencionó en la Introducción, agentes que modifican las propiedades físico-químicas de las membranas biológicas alteran también la función de las proteínas insertas en ellas [16]. La GSH-transferasa microsómica estudiada, es una enzima cuya forma activa es el dímero -S-S- [17], por lo tanto, agentes reductores como también agentes físicos que alteren la conformación de la membrana microsómica, podrían provocar cambios en la actividad enzimática de la GSH-transferasa. El extracto de quínoa inhibió la actividad GSH-transferásica, sin embargo, Tritón X-100 la activó (figuras 7 y 8), indicando con ello, que los mecanismos involucrados en los cambios de esta actividad enzimática observados, son diferentes. Más aún la incubación de los microsomas con la mezcla compuesta por 5µL de extracto que inhibió la enzima (~ 40%) y Tritón X-100 0,15%V/V que activó la enzima (~ 30%), produjo una inhibición del 10% de la actividad enzimática (figura 9). Estos resultados muestran que los efectos inhibitorio y activador sobre la actividad GSH-transferasa fueron aditivos (inhibición 40% + activación 30% = 10% de inhibición respecto de la actividad control). Este resultado parece indicar además que la concentración del extracto utilizada (5µL/0,2 mg de proteína microsómica), estaría expresando preferente su poder reductor sobre la GSH-transferasa y no su efecto surfactante.

Los cambios observados en la actividad GSH-transferásica se reflejaron en cambios en los valores de $V_{m\acute{a}x}$ y en la K_m para GSH; sin embargo, ninguno de ellos modificó la K_m para el sustrato 1-CI-2,4-DNB (Tabla 1). Cabe señalar que el único modificador que aumentó la $V_{m\acute{a}x}$ de la enzima control fue Tritón X-100 (0,15%V/V); el extracto, la mezcla del extracto (5 μ L) más Tritón X-100 (0,15%V/V) y DTT 4mM, disminuyeron la $V_{m\acute{a}x}$. Asimismo, el extracto de quínoa (5 μ L) solo y en mezcla con Tritón X-100 (0,15%V/V) aumentaron la K_m para el GSH 1,3 y 2,5 veces, respectivamente; Tritón X-100 en cambio que activó la enzima, disminuyó la K_m para el GSH en un 17% respecto del valor control. Probablemente, el efecto inhibitorio del extracto sobre la actividad de la GSH-transferasa observado fue provocado por los principios reductores presentes en él, los cuales involucran polifenoles y compuestos tiólicos; estos compuestos podrían tener un rol como disociadores del dímero catalíticamente activo, disminuyendo así esta actividad enzimática. Como una forma de corroborar este postulado, se evaluó el efecto reductor del extracto sobre la activación de la GSH-transferasa microsómica provocada por H_2O_2 , peróxido que favorece la formación del dímero catalíticamente activo de esta enzima [16]. En nuestras condiciones de ensayo, el H_2O_2 activó la GSH-transferasa aproximadamente en un 30%; el extracto de quínoa (5 μ L) en cambio, inhibió esta actividad enzimática en un 45%. La incubación de los microsomas con el extracto antes y después de adicionar H_2O_2 , previno y revirtió la activación de la GSH-transferasa provocada por H_2O_2 . Estos resultados apoyan nuestro

postulado, indicando que el poder reductor de tioles del extracto de quínoa sería el principal responsable de la inhibición de la actividad GSH-transferásica microsómica observada.

Cabe hacer notar que estos son los primeros antecedentes acerca de la actividad antioxidante de un extracto de episperma del grano de quínoa. Es relevante, la presencia no sólo de polifenoles, sino además, de compuestos tiólicos en este extracto. Dado que la presencia de compuestos tiólicos antioxidantes en extractos herbales es poco habitual, abre un nuevo campo de investigación enfocado a la acción como antioxidante biológico de estos compuestos.

V. REFERENCIAS

1. Mujica A. Andean grains and legumes. In: Bermujo H., Leon J. (eds), *Neglected Crops: 1492 from a Different Perspective*. FAO, Rome, (1994) 26: 131-148.
2. Wright K.H., Huber K.C., Fairbanks D.J., Huber C.S. Isolation and characterization of *Atriplex hortensis* and sweet *Chenopodium quinoa* starches. *Cereal Chem.* (2002a) 79(5): 715-719.
3. Repo-Carrasco R., Espinoza C., Jacobsen S.E. Nutritional value and use of the Andean crops quinoa (*Chenopodium quinoa*) and kaniwa (*Chenopodium pallidicaule*). *Food Rev.* (2003) 19(1–2): 179-189.
4. Girma M.W., Wink M. Identification and Biological Activities of Triterpenoid Saponins from *Chenopodium quinoa*. *J. Agric. Food Chem.* (2001) 49: 2327-2332.
5. Comai S., Bertazzo A. The content of proteic and nonproteic (free and protein-bound) tryptophan in quinoa and cereal flours. *Food Chem.* (2007) 100: 1350-1355.
6. Kuljanabagavad T., Wink M. Biological activities and chemistry of saponins from *Chenopodium quinoa* Willd. *Phytochem. Rev.* (2009) 8: 473-490.
7. Brinegar C., Goundan S. Isolation and Characterization of Chenopodin, the 11s Seed Storage Protein of Quinoa (*Chenopodium quinoa*). *J. Agric. Food Chem.* (1983) 47: 182-185.

8. Oakenfull D., Sidhu G.S. Could saponins be a useful treatment for hypercholesterolaemia? *Eur. J. Clin. Nutr.* (1990) 44: 79–88.
9. Gee J.M., Price K.R., Ridout I.T., Johnson I.T., Fenwick G.R. Effects of some purified saponins on transmural potential difference in mammalian small intestine. *Toxicol. In Vitro* (1989) 3: 85–90.
10. Estrada A., Laarveld B. Adjuvant action of *Chenopodium quinoa* saponins on the induction of antibody responses to intragastric and intranasal administered antigens on mice. *Com. Immune. Microbiol.& Infect.* (1998) 21: 225-236.
11. Droge W. Free radicals in the physiological control of cell function. *Physiol. Rev.* (2002) 82: 47-95.
12. Benzie I.F. Evolution of antioxidant defence mechanisms. *Eur. J. Nutr.* (2000) 39: 53-61.
13. Halliwell B. Biochemistry of oxidative stress. *Biochem. Soc. Trans.* (2007) 35: 1147-1150
14. Halliwell B., Gutteridge J.M.C. *Free radicals in biology and medicine*, (4th ed), Oxford University Press, Oxford ; New York, 2007.
15. Bors W., Michel C. Chemistry of the antioxidant effect of polyphenols. *Ann N Y Acad. Sci.* (2002) 957: 57-69.

16. Letelier M.E., Pimentel A., Pino P., Lepe A., Faúndez M., Aracena P., Speisky H. Microsomal UDP-glucuronyltransferase from rat liver. Oxidative activation. *Basic. Clin. Pharmacol. Toxicol.* (2005) 96: 480-486.
17. Aniya Y., Naito A. Oxidative stress-induced activation of microsomal glutathione Stransferase in isolated rat liver. *Biochem. Pharmacol.* (1993) 45: 37-42.
18. Lowry O.H., Rosebrough N.J., Farr A.L., Randall R.J. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol. Chem.* (1951) 193: 265-275.
19. Letelier M.E., Lepe A., Faundez M., Salazar J., Marin R., Aracena P., Speisky H. Possible mechanisms underlying copper-induced damage in biological membranes leading to cellular toxicity. *Chembioint.* (2005) 151: 71-82.
20. Letelier M.E., Cortés J., Lepe A.M., Jara J., Molina-Berríos A., Rodríguez C., Iturra-Montecinos P., Faúndez M. Evaluation of the antioxidant properties and effects on the biotransformation of commercial herbal preparations using rat liver endoplasmic reticulum. *BLACPMA.* (2009) 8(2): 110-120.
21. Eling W. Ficoll fractionation for the separation of parasitized erythrocytes from malaria infected blood. *Bull. World Health Organ.* (1977) 55:105-114

22. Gratzer W.B., Beaven G.H. Transparent starch gels: preparation, optical properties and application to hemoglobin characterisation. *Clin. Chim. Acta.* (1960) 5: 577-582.
23. Letelier M.E., Martínez M., González-Lira V., Faúndez M., Aracena-Parks P. Inhibition of cytosolic glutathione S-transferase activity from rat liver by copper. *Chemico-Biological Interactions.* (2006) 164: 39 - 48.
24. Bravo L. Polyphenols: Chemistry, Dietary Sources, Metabolism, and Nutritional Significance. *Nutr. Rev.* (1998) 56(11): 317-333.
25. Sies H. Oxidative Stress: Oxidants and antioxidants. *Exp. Physiol.* (1997) 82: 291-295.
26. Halliwell B., Gutteridge JMC. *Free Radicals in Biology and Medicine* (2nd ed.). Oxford, UK: Clarendon, 1989.
27. Schafer F., Buettner G. Redox environment the cell as viewed through the redox state of the glutathione disulfide/glutathione couple. *Free Radic. Biol. Med.* (2001) 30(11): 1191–1212.
28. Gilbert HF. Thiol/disulfide exchange equilibria and disulfide bond stability. *Methods Enzymol.* (1995) 251:8-28.
29. Dean P. J. Radical-free biology of oxidative stress. *Am J Physiol Cell Physiol* (2008) 295: 849–868.

30. Terrence J., Monks, Serrine S. L. The Farmacology and Toxicology polyphenolic-glutathione conjugates. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* (1998) 28: 229-255.
31. Fu H.W., Moomaw J.F., Moomaw C., Casey P.J. Identification of a cysteine Residue Essential for Activity of Protein Farnesyltransferase. *J.Biol.Chem.* (1996) 271(45): 28541–28548.
32. Letelier M.E., Molina A., Cortes J., Jara J., Holst M., Palma K., Montoya M., Miranda D., Gonzalez-Lira V. DPPH and oxygen free radicals as pro-oxidant of biomolecules. *Toxicol. in Vitro* (2008) 22: 279–286.