

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



ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE DE LOS EXTRACTOS SECOS DE *Melissa officinalis* (MELISA) Y *Rosmarinus officinalis* (ROMERO)

PATROCINANTE

Prof. María Eugenia Letelier M.

Laboratorio de Farmacología.

Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas.

Universidad de Chile.

DIRECTOR DE MEMORIA

Prof. María Eugenia Letelier M.

Laboratorio de Farmacología.

Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas.

Universidad de Chile.

Proyecto de Memoria para optar al título de Químico Farmacéutico

Carmen Luz Villar Bustamante

SANTIAGO DE CHILE

2012

“A mis padres, por amarme incondicionalmente y además de enseñarme que la perseverancia alcanza”.

AGRADECIMIENTOS

Primero que nada quiero agradecer a Dios y a la Santísima virgen, por estar siempre a mi lado y nunca abandonarme. Gran parte de este logro es merito de mis padres. A mi madre, gracias por amarme tanto y guiarme día a día en esta carrera tan difícil que es la vida. A mi padre, porque me enseñó que uno siempre puede marcar la diferencia, por ser un hombre realmente sabio. Los amo mucho.

A mi madrina Helia “Helita”, por amarme tanto y mantenerme cerca de Dios y la Virgen santísima. A mi tía Flor “Belita”, por que desde que éramos pequeños, se hacia cargo de mi y mis hermanos, junto con mi abuelita “mami”. Y ahora, ayuda a mi madre a cuidar de mis hijos. También este logro es de ustedes. A mis hermanos Rodrigo y Javier, por estar presentes siempre. Los amo mucho. A mi prima: Carolina Silvana, por enseñarme que el corazón no tiene límite para amar. A mi gran Familia por su apoyo incondicional.

A mis amigos, con los que me encontré en distintos años de la carrera, Maria José Queupil, Maryering Rain, Beatriz Piquer, Grace Cordero, Cristian Cáceres, Gracias por su apoyo.

Quiero expresar mis más sinceros agradecimientos a mi maestra, Profesora Maria Eugenia Letelier, por tener tanta paciencia conmigo, además de la confianza entregada. He crecido mucho a su lado, me mostro el lado científico desconocido para mi. Gracias por su apoyo y sus consejos. La quiero mucho.

A la Sra. Ximena Polanco por el apoyo brindado en este trabajo. A la Sra. Sdenka Barbery por su tiempo brindado en la preparación de los extractos. Al profesor Mario Faúndez, por su tiempo dedicado en este trabajo.

A mis colegas de Laboratorio, Valentina Venegas, Daniel Rojas, Felipe Hidalgo, Juan Cortés, Andrea Müller, Karla Cortés; les agradezco la paciencia y el tiempo que me han dedicado, han sido un apoyo fundamental en una parte importante de mi vida, especialmente Valentina. A don José Riquelme, por su apoyo, ayuda y consejos. A don Julio Garmendía, por apoyarme a lo largo de la carrera, y darme fuerzas para superar los contratiempos que está presentaba.

A mi marido, compañero fiel, Jorge Emilio, quiero agradecer tu apoyo incondicional, a lo largo de este proceso, lo viviste desde el comienzo a mi lado. Además quiero agradecer a mis dos hijos hermosos: Jorge Antonio y Matías Rodrigo; nuestra familia, por la cual luchamos juntos día a día. Muchas gracias. Los amo mucho a los tres.

ÍNDICE GENERAL

	Página
DEDICATORIA	II
AGRADECIMIENTOS	III
INDICE GENERAL	IV
INDICE DE FIGURAS	VI
INDICE DE TABLAS	VII
RESUMEN	VIII
SUMMARY	IX
I. INTRODUCCIÓN	1
Hipótesis	8
Objetivo general	8
Objetivos específicos	8
II. MATERIALES Y MÉTODOS	9
Reactivos	9
Animales de experimentación	9
Preparación de microsomas hepáticos de rata	9
Determinación de proteínas	11
Cuantificación de polifenoles	11
Lipoperoxidación microsómica	11
Condiciones oxidativas	12
Determinación de tioles microsómicos	13

Tioles microsómicos en presencia de Cu^{+2}	14
Espectro de absorbancia del Cu^{2+} en presencia extractos de melisa y romero	15
N-desmetilación aminopirina	15
Análisis estadístico	17
III. RESULTADOS	18
Cuantificación de tioles totales	18
Lipoperoxidación microsómica extracto de melisa	18
Lipoperoxidación microsómica extracto de romero	20
Protección tioles microsómicos extracto de melisa	23
Protección tioles microsómicos extracto de romero	24
Tioles microsómicos en presencia de Cu^{2+}	25
Espectro de absorbancia de Cu^{2+} en presencia de extracto melisa	27
Espectro de absorbancia de Cu^{2+} en presencia de extracto romero	28
N – desmetilación de aminopirina	30
Resumen de resultados	32
IV. DISCUSIÓN	34
V. REFERENCIAS	38

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura N°		Página
1	Efecto de melisa sobre la lipoperoxidación microsómica inducida por Cu^{2+} /ascorbato	19
2	Curva semilogaritmica del efecto de melisa sobre la lipoperoxidación microsómica inducida por Cu^{2+} /ascorbato	20
3	Efecto de romero sobre la lipoperoxidación microsómica inducida por Cu^{2+} /ascorbato	21
4	Curva semilogaritmica del efecto de romero sobre la lipoperoxidación microsómica inducida por Cu^{2+} /ascorbato	22
5	Efecto de extracto melisa sobre la oxidación de tioles microsómicos inducido por sistema Cu^{2+} /ascorbato.	23
6	Efecto de extracto romero sobre la oxidación de Tioles microsómicos inducido por sistema Cu^{2+} /ascorbato	24
7	Tioles microsómicos en presencia de Cu^{2+}	26
8	Espectro de absorbancia solución CuSO_4 0,5mM en presencia extracto melisa.	27
9	Espectro de absorbancia solución CuSO_4 0,5mM en presencia extracto romero.	29
10	Curva de calibración Formaldehido	30
11	N-desmetilación de aminopirina a través del sistema citocromo P450.	31

ÍNDICE DE TABLAS**Página**

TABLA 1	Cuantificación de polifenoles totales	18
TABLA 2	Absorbancia máxima de CuSO_4 en presencia de melisa.	28
TABLA 3	Absorbancia máxima de CuSO_4 en presencia de romero.	29
TABLA 4	Resumen de resultados	33

ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE DE LOS EXTRACTOS SECOS DE *Melissa officinalis* (MELISA) Y *Rosmarinus officinalis* (ROMERO)

Los polifenoles herbales están representados por un grupo de compuestos que incluyen moléculas lipofílicas y polares. Plantas medicinales utilizadas para mitigar patologías psicotrópicas deben contener principios activos lipofílicos que sean capaces de atravesar la barrera hemato-encefálica. Diversos estudios demuestran la asociación de la enfermedad de Alzheimer's y la de Parkinson's a estrés oxidativo, fenómeno que parece estar relacionado con concentraciones elevadas de hierro y cobre que se han descrito en neuronas de estos pacientes. De aquí nuestro interés en evaluar la capacidad antioxidante de extractos secos estandarizados de hojas de *Melissa officinalis* (melisa) y *Rosmarinus officinalis* (romero), plantas utilizadas para mitigar efectos psicotrópicos como ansiedad y depresión. Para ello, se utilizó como sistema biológico una preparación enriquecida en retículo endoplásmico hepático de rata (microsomas) y como sistema oxidante, Cu^{2+} /ascorbato.

Ambos extractos previnieron la lipoperoxidación microsómica inducida por Cu^{2+} /ascorbato. Además, ellos fueron capaces de prevenir la disminución de los tioles proteicos inducida por Cu^{2+} ya sea en presencia como en ausencia de ascorbato. Esto indica que los principios activos presentes en estos extractos podrían ejercer su acción antioxidante al menos a través de dos mecanismos: a) atrapamiento de radicales libres del oxígeno y b) quelación de iones metálicos que generan ROS a través de las reacciones de Haber-Weiss y/o Fenton. Más aún, ambos extractos fueron capaces de inhibir la actividad N-desmetilante de aminopirina del sistema CYP450, el cual metaboliza sustratos lipofílicos. Cabe resaltar que los efectos de romero fueron significativamente superiores a los de melisa. Estos resultados aunque preliminares, son promisorios y nuevos experimentos están en curso conducentes a evaluar en modelos animales la eficacia y seguridad de estos extractos.

**ANTIOXIDANT CAPACITY OF DRIED EXTRACTS OF *Melissa officinalis*
(MELISA) Y *Rosmarinus officinalis* (ROMERO)**

Herbal polyphenols are represented by a group of compound that includes lipophilic and polar compounds. Medicinal plants used to mitigate psychotropic pathologies must contain active lipophilic principles capable of crossing the blood-brain barrier. Studies have shown the association of Parkinson's and Alzheimer's diseases to oxidative stress, phenomenon that seem to be related with elevated concentrations of iron and copper In the neurons of these patients. Hence our interest in evaluating the antioxidant capacity of standardized dry extracts of *Melissa officinalis* (lemon balm) and *Rosmarinus officinalis* (rosemary) leaves, plants used to mitigate psychotropic effects such as anxiety and depression. An enriched preparation of rat liver endoplasmic reticulum (microsomes) was used as a biological system in and Cu^{2+} /ascorbate, as oxidant system.

Both extracts prevented microsomal lipid peroxidation induced by Cu^{2+} /ascorbate. Furthermore, they were able to prevent the decrease of protein thiols induced by Cu^{2+} either in the presence or absence of ascorbate. This indicates that the principles antioxidants in rosemary and lemon balm extract may exert its cellular antioxidant activity through at least two mechanisms: a) trapping of oxygen free radicals and b) chelation of metals ions, which generate ROS through Haber-Weiss and/or Fenton reactions. Moreover, both extracts were able to inhibit the aminopyrine N-demethylating activity of CYP450 system, which metabolizes lipophilic compounds. It necessary to point out that the effects of rosemary were significantly higher than balm. These results, though preliminary, are promising and further experiments are underway leading in animal models to evaluate the efficacy and safety of these extracts.

I. INTRODUCCION

Las patologías del sistema nervioso central constituyen una preocupación a nivel de los sistemas de salud por el aumento en su prevalencia y severidad. Entre ellas destacan las enfermedades neurodegenerativas, patologías que consisten en trastornos cognitivos debidos a un incremento en los procesos de muerte celular, disminuyendo el número de neuronas y generando cambios en la conducta, aprendizaje y memoria de los pacientes^[1]. Entre las enfermedades neurodegenerativas más importantes encontramos la enfermedad de Parkinson's, de Alzheimer, de Huntington, la esclerosis múltiple y la esclerosis lateral amiotrófica.

Diversos estudios han mostrado que el estrés oxidativo mediado por especies reactivas del oxígeno (anión superóxido, radical hidroxilo y peróxido de hidrógeno), estaría involucrado en los procesos de neurodegeneración^[2]. En general todas las patologías, en mayor o menor grado, están asociadas a estrés oxidativo, entre ellas las enfermedades cardiovasculares, el cáncer, la enfermedad de Parkinson, la diabetes y la artritis reumatoide^[3]. Las enfermedades neurodegenerativas han mostrado acumulación de metales de transición en su estado iónico como el Cu^{2+} y el Fe^{3+} a nivel neuronal^[4]. Cabe destacar que los iones Cu^{2+} son esenciales en la respiración celular, defensa antioxidante, función neurotransmisora, biosíntesis de tejidos conectivos y metabolismo celular de hierro. Sin embargo, las propiedades químicas biológicas que puede usar el cobre son también potencialmente tóxicas^[5]. Los iones Cu^{2+} y el Fe^{3+} en su estado reducido Cu^+ y el Fe^{2+} , son capaces de generar especies reactivas del oxígeno a través de las reacciones de Haber Weiss y/o Fenton^[6].

La primera línea de terapia para los pacientes que sufren patologías neurodegenerativas son los agentes psicotrópicos ansiolíticos, antidepresivos, anticonvulsivantes, antimaníacos, etc. Estas terapias se han asociado al uso de

antioxidantes con buenos resultados, confirmando así la presencia de estrés oxidativo en estas patologías^[7]. El fenómeno de estrés oxidativo se produce si se sobrepasa la capacidad antioxidante celular y en estas patologías este fenómeno sería provocado por la concentración de iones metálicos libres. Estos antecedentes justifican el gran interés actual en la investigación focalizada en el desarrollo de antioxidantes naturales que permitan su uso en el tratamiento de patologías neurodegenerativas^[8-10].

Las plantas medicinales juegan hoy en día un rol importante en las sociedades culturales y en el cuidado de la salud de la población urbana y rural a nivel mundial. La mayoría de las investigaciones han sido enfocadas hacia la capacidad antioxidante de los compuestos polifenólicos. Los mecanismos antioxidantes de los polifenoles incluyen atrapamiento de radicales libres y quelación de iones metálicos de transición. Este último mecanismo previene la generación de radicales libres del oxígeno a través de las reacción de Haber-Weiss y/o Fenton^[6].

Ascorbato + metal oxidado → radical ascorbilo + metal reducido

Metal reducido + O₂ → metal oxidado + O₂^{•-} (Haber-Weiss)

Metal reducido + H₂O₂ → metal oxidado + [•]OH + OH⁻ (Fenton)

Compuestos antioxidantes naturales. Además de los polifenoles, los compuestos tiólicos celulares (cisteína, GSH) pueden atrapar radicales libres del oxígeno; sin embargo, existen diferencias en las propiedades redox de ambos tipos de compuestos: la oxidación de las biomoléculas tiólicas a compuestos disulfuros, puede ser revertida por agentes antioxidantes tiólicos, no así la oxidación de los fenoles a quinonas^[11-15]. En todo tipo de células esta reversibilidad es el resultado de mecanismos enzimáticos concertados, los

cuales involucran el uso de GSH, el antioxidante no enzimático más abundante celular^[16].

Cabe destacar además, que los compuestos polifenólicos como los tiólicos, además de participar en reacciones redox, pueden actuar como agentes nucleofílicos. Como tales ellos pueden quelar iones metálicos de transición tales como cobre y hierro y además, pueden formar aductos covalentes con metabolitos electrofílicos, los cuales pueden ser generados como producto de la biotransformación de xenobióticos, entre ellos los fármacos^[17-21]. Cuando tioles y polifenoles reaccionan como nucleófilos se consumen irreversiblemente. Más aún, la formación de S-aductos con los compuestos electrofílicos puede ocurrir no enzimáticamente en la célula animal y también puede ser catalizada por una familia de enzimas ampliamente distribuidas en el organismo, las GSH-transferasas (GST)^[17-21]. Como se mencionó anteriormente, varias patologías incluyendo las enfermedades neurodegenerativas están asociadas con la acumulación de dichos iones metálicos. Por lo tanto, la capacidad quelante de los compuestos tiólicos y polifenólicos puede ser relevante en el tratamiento de estas enfermedades, pero implica que los compuestos antioxidantes posean la suficiente lipofilicidad que les permita atravesar la barrera hemato-encefálica.

Las terapias complementarias o alternativas han tenido un crecimiento en popularidad y se han aplicado en problemas de salud, incluida la demencia. Así, se han publicado evidencias de los efectos sobre los desordenes psiquiátricos en animales producidos por diferentes preparados de plantas medicinales, entre ellas *Melissa officinalis* (melisa)^[22] y *Rosmarinus officinalis* (romero)^[23]. Se desconoce actualmente cuál o cuáles serían las moléculas responsables de los efectos terapéuticos observados. Más aún, las dosis recomendadas de estos preparados no producen los efectos adversos asociados a las drogas psicotrópicas convencionales. Así por ejemplo, entre los antipsicóticos de segunda generación, la clozapina y la olanzapina se asocian a un mayor riesgo

de aumento de peso clínicamente significativo, diabetes y dislipidemias^[24]. Por otra parte, los efectos secundarios más destacados de los derivados de los antidepresivos tricíclicos son la sedación, los efectos anticolinérgicos (sequedad de boca, visión borrosa, estreñimiento, retención urinaria, agitación, confusión), los efectos cardiovasculares (hipotensión ortostática, taquicardia, arritmias), la hipertrofia prostática, el glaucoma de ángulo cerrado, y el aumento de peso^[24].

***Melissa officinalis* L. (melisa).** Planta de la familia *Lamiaceae* (Labiatae), originaria del área mediterránea de Europa, oeste de Asia y norte de África, el toronjil o melisa es una planta herbácea perenne, con tallos cuadrangulares y ramificados de 30 a 90cm, sobre los cuales se encuentran numerosas yemas. Las hojas son opuestas, ovales, pecioladas, sumamente dentadas. Las flores, de color blanco o rosadas, amarillentas antes de abrirse, están agrupadas de 6 a 12 en las axilas de las hojas^[25]. Las hojas tienen un aroma agradable, similar al del limón. La vida útil de esta especie es de 3 a 4 años^[25]. Actualmente se cultiva en Europa central y oriental y en zonas templadas septentrionales, y crece en forma silvestre en zonas húmedas y soleadas. No resiste bien las heladas^[25]. La droga vegetal está constituida por sus hojas, ovales y cordiformes, las cuales contienen de 10 a 12% de elementos minerales, taninos, ácidos fenólicos, ácido succínico, mucílagos, resina y aceite esencial. Este último (0,1 a 0,3%) es de color amarillo claro y contiene principalmente citral (30% (geranial + neral)) y citronelal (40%), además de los monoterpenos: citronelol, linalool y geraniol (17,3%); óxido de cariofileno, ocimeno, flavonoides y compuestos amargos que cristalizan (ursol)^[25]. Los fitofármacos a base de melisa son utilizados por vía oral. Tradicionalmente, decoctos de sus hojas se han utilizados en el tratamiento sintomático de estados neurotóxicos de adultos y niños, especialmente en casos de trastornos menores del sueño. Por otra parte, se ha demostrado que el aceite esencial se comporta como antibacteriano y antifúngico y tendría también, propiedades espasmolíticas^[25]. La acción sedante del extracto hidroalcohólico demostrada en ratón no ha sido

confirmada; sin embargo, el extracto potencia el sueño inducido por pentobarbital. Cabe destacar un estudio bastante antiguo, no confirmado por otros ensayos, el cual resalta el interés de la melisa en distonías neurovegetativas. Estudios realizados en ratones demostraron que el extracto hidroalcohólico (30% etanol) de las hojas de melisa provocaba sedación y potenciaba el sueño en estos animales; sin embargo, el aceite esencial no mostró efectos sedantes^[26].

Rosmarinus officinalis L. (romero). Planta de la familia *Lamiaceae* (Labiatae), originaria de la zona costera rocosa, con suelo calcáreo, del mediterráneo y de África^[25]. Es una planta siempre verde, leñosa, subarborescente, con hojas de color pardo y en estado juvenil. La longitud de las hojas varía entre 15 y 40mm, son estrechas, perennes, opuestas, sésiles, lanceoladas, con los bordes enteros, de color verde brillante y coriáceo, algo granuloso por el haz, suave y blanquecino por el envés. La planta puede medir hasta 1,8m de altura^[25] y vivir más de 10 años. Las flores pequeñas, bilabiadas y de color azulado, aparecen desde fines de primavera hasta principios de verano^[25]. Esta planta es típica del sur de Europa, en la cuenca mediterránea, norte de África y Suroeste de Asia. En Chile, puede ser encontrado entre la V y IX región^[27]. Crece silvestre sobre todo tipo de sustratos, en matorrales o aledaño a las costas, hasta una altura cercana a los 2800m^[25]. Los principales países productores son: España, Túnez, Marruecos y en menor medida, la ex-Yugoslavia, Portugal, Turquía e India.

Las hojas, los ápices en flor y los tallos contienen aceite esencial en el cual se ha identificado 1,8 – cineol y 1,8 – pineno, alcanfor, acetato de bornilo, camfeno, linalool, d-limoneno, borneol, mirceno, terpineol y cariofileno y principios amargos^[25]. El aceite esencial se extrae por arrastre de vapor o con solventes orgánicos^[25]. Además, el Romero tiene ácido rosmarínico, rosmarinil-difenol y ácido carnósico, que son potentes antioxidantes y principales

componentes de la oleoresina de romero^[25]. Preparados de la droga vegetal (inflorescencia) se utilizan tradicionalmente por vía oral en el tratamiento sintomático de trastornos digestivos. Por vía tópica sus preparados han sido utilizados tradicionalmente en el tratamiento como coadyuvante de afecciones reumáticas, catarros y como enjuague bucal. Otras actividades terapéuticas atribuidas a los preparados de romero incluyen acciones como agente antimicrobiano, antiespasmódico, actividades antihipertensivas y sedativas^[25]. Respecto de sus propiedades psicotrópicas son escasos los antecedentes en la literatura^[23]. Los usos de sus preparados están contraindicados en embarazadas ya que ha sido señalado como abortivo^[25].

Las hojas de romero, enteras o molidas, se utilizan para condimentar sopas, salsas, carne, pescado, etc. Su aceite esencial se agrega a alimentos, perfumes y cosméticos (jabón, cremas, desodorantes, tónicos para el pelo y champú), como también, a desinfectantes e insecticidas^[25]. Preparados de romero son también utilizados en la industria agroalimentaria por las propiedades antioxidantes de sus diterpenos^[27]. La actividad antioxidante de los extractos de romero se ha evidenciado sobre diferentes modelos y con diversos productos alimenticios. Esta actividad se debería, al menos en parte, al ácido rosmarínico y a los *o*-fenoles diterpénicos, cuya eficacia es superior a la de los antioxidantes sintéticos utilizados en la actualidad.

Los antecedentes presentados muestran que preparados de las hojas de *Melissa officinalis* (melisa) y *Rosmarinus officinalis* (romero) presentan algunas acciones terapéuticas a nivel de sistema nervioso central, como son la actividad sedante y antidepresiva. Asimismo, extractos de las hojas de ambas plantas presentan actividad antioxidante, que se deberían al menos en parte, a la presencia de compuestos polifenólicos^[22-23]. Ambas actividades farmacológicas, actividad psicotrópica y antioxidante a nivel neuronal, requieren la presencia en estos extractos de compuestos lipofílicos capaces de atravesar la barrera

hemato-encefálica. Es por ello que en este trabajo se estudió la capacidad antioxidante de los extractos secos estandarizados de *Melissa officinalis* (melisa) y *Rosmarinus officinalis* (romero); estos experimentos se orientaron a la prevención de procesos redox sobre biomoléculas lipofílicas y/o localizadas en membranas biológicas. Así, como sistema biológico, se utilizó una preparación experimental de retículo endoplásmico hepático de rata (microsomias) y como sistema pro-oxidante, Cu^{2+} /ascorbato. Los ensayos realizados fueron: 1) prevención de la lipoperoxidación microsómica y de la disminución de los tioles microsómicos, ambos fenómenos inducidos por Cu^{2+} /ascorbato; 2) la capacidad de estos extractos de quelar iones Cu^{2+} mediante la alteración del espectro de absorbancia de una solución de CuSO_4 ; 3) la capacidad de inhibir la N-desmetilación de aminopirina, reacción catalizada por el sistema oxidativo CYP450, el cual cataliza la biotransformación de xenobióticos lipofílicos^[27].

Ambos extractos mostraron actividad anti-lipoperoxidante, la cual fue concentración-respuesta. De la misma forma, ambos extractos inhibieron la oxidación de los tioles microsómicos. Por otra parte, ellos alteraron el espectro de absorbancia del Cu^{2+} e inhibieron la actividad N-desmetilante de aminopirina. Estos resultados, aunque preliminares, son promisorios para el desarrollo de nuevos fitofármacos que puedan ser utilizados como terapia asociada al tratamiento de enfermedades neurodegenerativas como también para mejorar la calidad de vida de las personas de la tercera edad.

HIPÓTESIS

Los extractos secos provenientes de hojas de melisa y romero presentan propiedades antioxidantes sobre componentes de membranas biológicas y son capaces de inhibir significativamente la actividad enzimática del sistema oxidativo del CYP450.

OBJETIVOS

Objetivo general

Evaluar la capacidad anti-lipoperoxidante y de inhibir la oxidación de los tioles microsómicos de los extractos secos de melisa y romero, como también, su capacidad de quelar Cu^{2+} , ión que en su estado libre y reducido genera especies radicalarias del oxígeno.

Objetivos específicos

1. Determinar el contenido total de polifenoles de los extractos de melisa y romero.
2. Evaluar comparativamente la capacidad de los extractos de prevenir la lipoperoxidación microsómica inducida por el sistema Cu^{2+} /ascorbato.
3. Determinar la capacidad de los extractos de prevenir la oxidación de los tioles microsómicos provocada por el sistema Cu^{2+} /ascorbato.
4. Evaluar la capacidad quelante de Cu^{2+} de los extractos de melisa y romero.
5. Determinar la actividad N-desmetilante de aminopirina del sistema oxidativo CYP450 en microsomas hepáticos de rata.

II. MATERIALES Y MÉTODOS

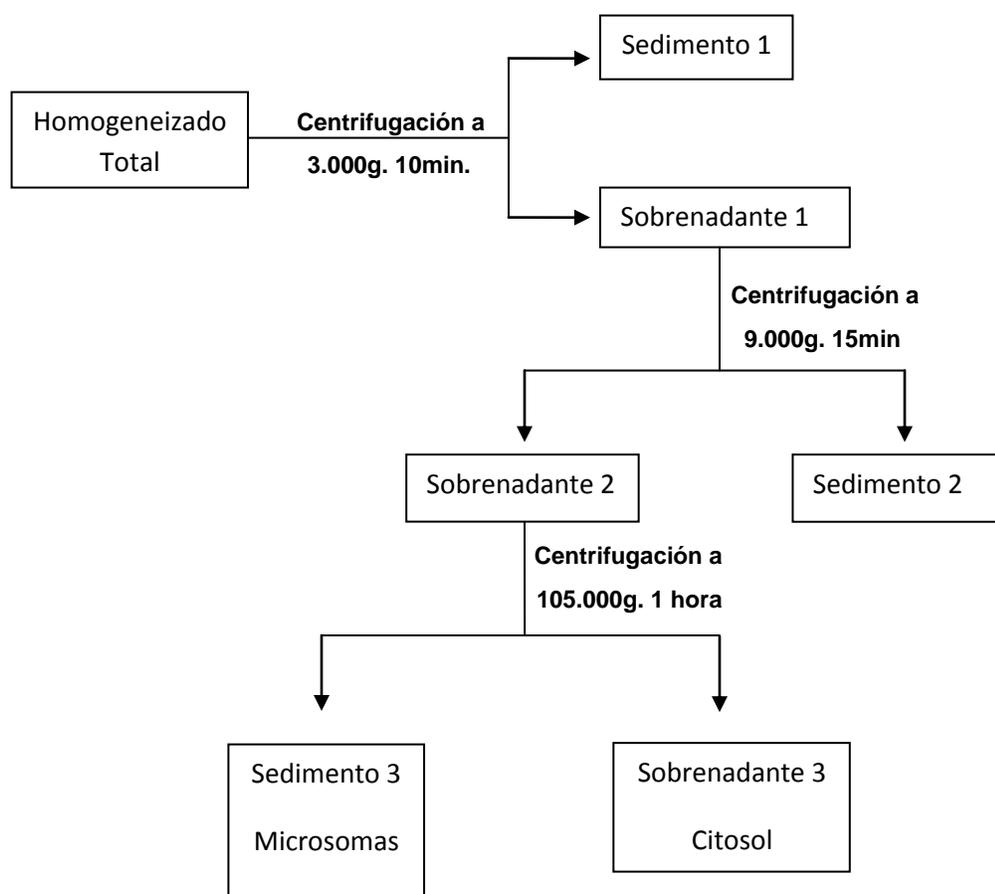
Reactivos. Catequina [(+)-cianidol-3, (2R, 3S)-2-(3,4-dihidroxifenil)-3,4-dihidro-1(2H)-benzopiran-3, 5,7-triol], ascorbato de sodio, se obtendrán de Sigma-Aldrich. El ácido 5,5'-ditiobis-(2-nitrobenzoico) (DTNB), la albúmina sérica de bovino (Fracción IV) serán obtenidos en Sigma Chemical Co (EE.UU.). El ácido tricloroacético (TCA), el ácido tiobarbitúrico (TBA), el CuSO_4 y el reactivo de Folin-Ciocalteu's serán adquiridos en Merck (Chile). El resto de los reactivos utilizados fueron del mejor grado analítico.

Los extractos herbales serán donados por Laboratorios Ximena Polanco (Santiago, Chile).

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

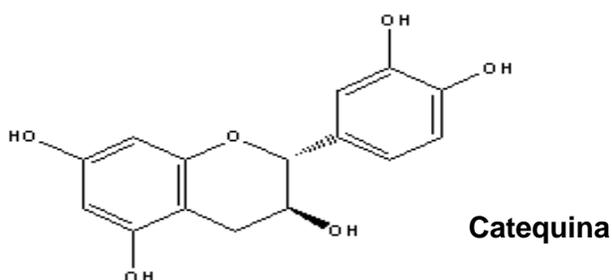
Preparación de microsomas hepáticos de rata. Esta fracción subcelular fue preparada de acuerdo a Letelier y cols., 2010 ^[28]. Las ratas fueron sometidas a ayuno por 15h con agua ad libitum y sacrificadas por decapitación. Los hígados fueron perfundidos in situ con 0,9% p/V NaCl, removidos por incisión, y puestos en hielo. Todos los procedimientos de homogenización y fraccionamiento fueron realizados a 4°C, y todas las centrifugaciones fueron realizadas usando ya sea una centrifuga con refrigeración Hermle modelo Z326K o una ultracentrifuga Beckman modelo XL-90. El tejido hepático carente del tejido conectivo y vascular, fue homogenizado con 4 volúmenes de 0,154M de KCl, con ocho

pasajes en un homogeneizador Dounce Wheaton B utilizando un motor Heidolph modelo RZR1 a 250rpm. El homogeneizado fue centrifugado a 9.000g por 15min y el sedimento fue descartado. El sobrenadante obtenido fue centrifugado a 105.000g por 60min. El pellet (microsomos) fue almacenado a -80°C en un freezer- Il Shin modelo DF8514 hasta 3 meses. La cuantificación de la proteína microsómica se determino por el método de Lowry y cols., 1951^[29], utilizando albúmina sérica de bovino (fracción IV) como estándar.



Determinación de proteínas. La proteína de la fracción microsómica se determinó por el método de Lowry y cols., 1951^[29], utilizando albúmina de bovino, fracción IV como estándar.

Cuantificación de Polifenoles. La determinación de polifenoles totales se realizó de acuerdo al método de Letelier y cols., 2008^[30]. Este método utiliza catequina como estándar.

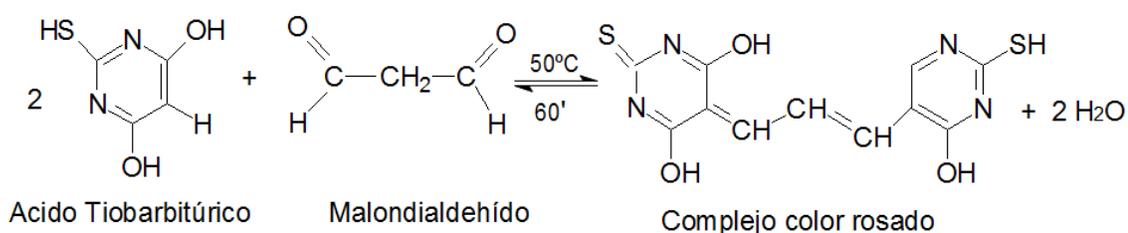


En un volumen final de 2mL la mezcla de reacción contenía: diferentes concentraciones de los extractos herbales, 100µL de reactivo Folin Ciocalteau, 300µL de carbonato de sodio 20% p/V y agua destilada suficiente para completar 2mL. El blanco contenía todos los reactivos con excepción de los extractos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

Lipoperoxidación microsómica: La lipoperoxidación microsómica inducida por el sistema Cu^{2+} /ascorbato se estimó determinando las sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico (TBARS) de acuerdo al método descrito por Letelier y cols., 2005^[5]. El malondialdehído, generado como producto de la descomposición de

los lipoperóxidos formados, reacciona con el ácido tiobarbitúrico dando lugar a un conjugado, el cual posee una absorbancia máxima a 532nm ($\epsilon_{532} = 156.000 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$).

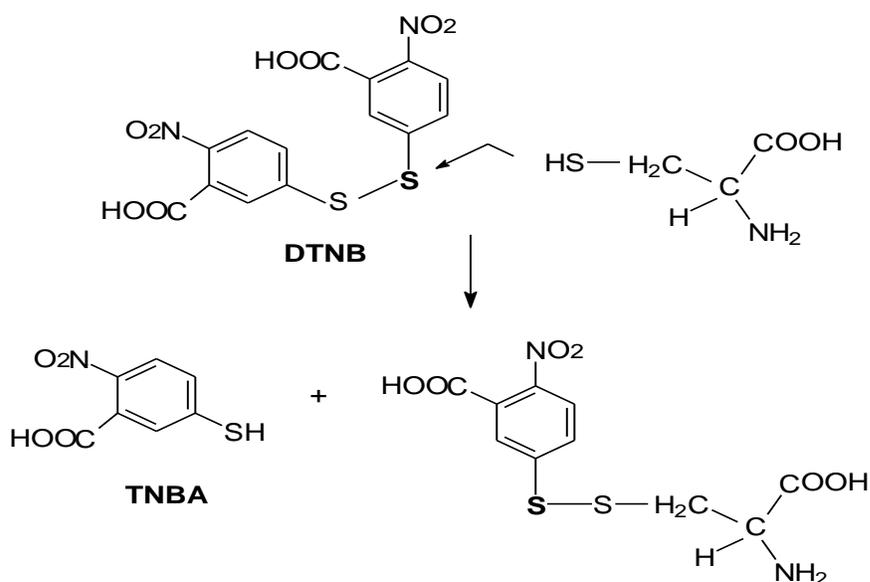
Las mezclas de reacción contenían en concentraciones finales: microsomas (0,5mg de proteína) suspendidos en amortiguador fosfato 50mM, pH 7,4 las cuales fueron preincubadas con los extractos durante 5min a 37°C antes de agregar el sistema oxidante Cu^{2+} /ascorbato. Los blancos contenían todos los reactivos con la única excepción de la proteína microsómica. Muestras y blancos fueron incubados en una baño termostático Julabo SW-21C, durante 20min a 37°C con agitación constante. Al cabo de este período, se les adiciono 0,25mL de TCA 20% p/V frío (4°C). Luego, fueron centrifugados a 9.000g durante 10min a 4°C en una centrífuga Hermle, modelo Z326K. Alícuotas de 0,5mL de los sobrenadantes de las muestras y los blancos fueron mezcladas con 0,5mL de TBA 35mM y luego, incubadas durante 60min a 50°C para el desarrollo de color. Al término de este periodo, se registró la absorbancia de las muestras a 532nm en un espectrofotómetro UV3 Unicam UV-VIS, usando los blancos como referencia. Los resultados fueron expresados en porcentaje de lipoperoxidación residual.



Condiciones oxidativas: Se utilizó el sistema generador de anión superóxido (O_2^-) CuSO_4 25 μM y ascorbato 1 μM , ambas concentraciones finales en la mezcla de reacción.

Determinación de tioles microsómicos. La medición de los tioles microsómicos se realizó de acuerdo a la técnica descrita por Letelier y cols., 2005^[5]. Esta técnica cuantifica espectrofotométricamente el TNB liberado en la reacción entre DTNB y los grupos sulfhidrilos presentes en la muestra. Este compuesto absorbe a 412nm y su coeficiente de extinción es $13.600 \text{ M}^{-1} \times \text{cm}^{-1}$.

La mezcla de reacción contenía los reactivos siguientes (concentraciones finales) en un volumen final de 1,5mL: amortiguador fosfato de potasio 50mM, pH 7,4; proteína microsómica 0,5mg/mL y DTNB 0,3mM. Las mezclas de reacción contenían microsomas (0,5mg/ml de proteína) los cuales fueron preincubadas con los extractos durante 5min a 37°C antes de agregar el sistema oxidante Cu^{2+} /ascorbato con amortiguador fosfato 50mM, pH 7,4. Los blancos contenían todos los reactivos con la única excepción de la proteína microsómica. Muestras y blancos fueron incubados en una baño termostático Julabo SW-21C, durante 20min a 37°C con agitación constante. Posteriormente, se agregó DTNB 0,3mM. Luego se incubó 1h a 37°C con agitación constante. Posteriormente centrifugaron a 15.000g durante 10min en una centrífuga refrigerada (4°C) Hermle modelo Z326K, con el objeto de decantar la suspensión microsómica. A continuación, las absorbancias de los sobrenadantes se leyeron a 412nm en un espectrofotómetro Unicam UV /VIS modelo UV3 acoplado a un computador, utilizando para ello sus blancos respectivos.



Tioles microsómicos en presencia de Cu²⁺. La medición de la actividad quelante se determinó midiendo la cantidad de tioles microsómicos residuales. Esta medición se realizó de acuerdo a la técnica descrita por Letelier y cols., 2005^[5]. Esta técnica cuantifica espectrofotométricamente el TNB liberado en la reacción entre DTNB y los grupos sulfhidrilos presentes en la muestra. Este compuesto absorbe a 412nm y su coeficiente de extinción es 13.600 M⁻¹ x cm⁻¹.

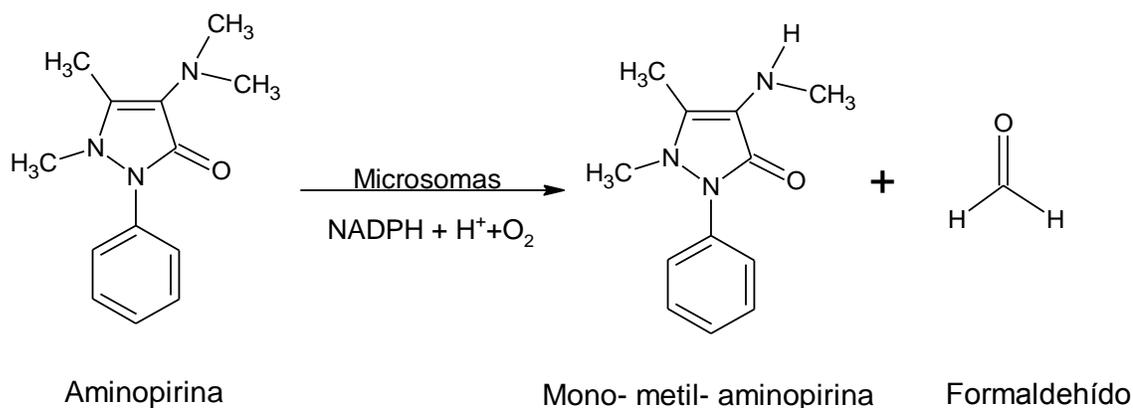
La mezcla de reacción contenía los reactivos siguientes (concentraciones finales) en un volumen final de 1mL: amortiguador fosfato de potasio 50mM, pH 7,4; proteína microsómica 0,25mg, CuSO₄ 50μM previamente incubado con 100μg de extracto a 37°C, durante 30min en un baño termostático Julabo SW-21C, con agitación constante y DTNB 0,3mM. Las muestras se incubaron durante 30min a 37°C en un baño termostático con agitación constante. Posteriormente se agregó DTNB 0,3mM. Luego se incubó 1h a 37°C a 125rpm. Luego se centrifugaron a 15.000g durante 10min en una centrífuga refrigerada (4°C) Hermle modelo Z326K, con el objeto de decantar la suspensión microsómica. Los blancos contenían todos los reactivos, a excepción de la

proteína microsómica. A continuación, las absorbancias de los sobrenadantes se leyeron a 412nm en un espectrofotómetro Unicam UV /VIS modelo UV3 acoplado a un computador, utilizando para ello sus blancos respectivos.

Espectro de absorbancia del Cu^{2+} en presencia de los extractos de melisa y romero. La medición de la actividad quelante se determinó realizando un barrido de una solución de CuSO_4 0,5mM entre 200 y 600nm en ausencia y presencia de los extractos en estudio. Para realizar el barrido de la solución de CuSO_4 0,5mM se utilizó buffer fosfato 50mM, pH 7,4 como blanco. Asimismo, el blanco correspondiente a las mezclas cobre – extracto contenía todos los reactivos a excepción del cobre. Las concentraciones de ambos extractos ensayadas fueron: 300 y 500µg/mL de mezcla. Estos ensayos se realizaron en un espectrofotómetro UV3 Unicam UV-VIS conectado a un computador.

N-desmetilación de aminopirina. Dado que se ha descrito que los preparados de hojas de melisa y romero actúan sobre el sistema nervioso central, la presencia en ellos de compuestos lipofílicos que atraviesen la barrera hematoencefálica es esencial. Es por ello que medimos la N-desmetilación de aminopirina, reacción catalizada por el sistema oxidativo del citocromo P450. La monooxigenasa CYP450 es la enzima que une el sustrato en la etapa limitante de la reacción cuya característica esencial para que esta unión se produzca, es su lipofilicidad.

La actividad N- desmetilante de este sistema oxidativo se determinó por el método descrito en Letelier y cols., 2009^[31], midiendo la absorbancia del formaldehído formado producto de la reacción enzimática. La ecuación química es la siguiente:



La mezcla de reacción contenía (concentraciones finales) en un volumen final de 1mL: amortiguador TRIS 50mM pH 8,5; MgCl₂ 4,0mM; proteína microsómica 2mg; concentraciones de los extractos herbales, equivalentes a 50µg de extracto por mg de proteína microsómica; aminopirina 2mM; sistema generador de NADPH constituido por glucosa-6-fosfato 6mM, NADP 0,6mM y glucosa-6-fosfato deshidrogenasa 5,0 Unidades.

Las muestras contenían todos los reactivos; los blancos, contenían todos los reactivos a excepción de la glucosa-6-fosfato deshidrogenasa. La reacción enzimática se inició agregando la glucosa-6-fosfato deshidrogenasa. A continuación, muestras y blancos se incubaron durante 15 min a 37°C en un baño termostático Julabo SW-21C, con agitación constante. La reacción se detuvo precipitando las proteínas con 500µL de TCA frío (4°C) 10% p/V. Luego, las mezclas se centrifugaron a 9.000g durante 10min a 4°C en una centrifuga refrigerada Hermle modelo Z326K. Alícuotas de 1mL de los sobrenadantes se mezclaron con 0,5mL de una mezcla constituida por 0,1mL de 2,4-pentandiona y 25mL de acetato de amonio 4M. Luego, se mantuvieron durante 2h a temperatura ambiente y en la oscuridad. Al término de este período, se leyó la absorbancia de las muestras a 414nm contra sus blancos respectivos en un espectrofotómetro UNICAM VIS modelo 3, acoplado a un computador. El producto de la reacción se cuantificó usando como estándar formaldehído. La

actividad enzimática fue determinada en condiciones de linealidad respecto de la concentración de proteína microsómica y del tiempo de incubación. La linealidad del método colorimétrico se comprobó realizando una curva estándar de formaldehído. La actividad enzimática se expresó en η moles de HCHO formado/ min/ mg de proteína microsómica.

Análisis estadístico. Los datos presentados corresponden al promedio de al menos 4 experimentos independientes \pm E.E. La significancia estadística t - student 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

Cuantificación de polifenoles totales. La Tabla 1 muestra que el extracto de romero contiene aproximadamente 4 veces la cantidad de polifenoles totales comparado con el extracto de melisa.

Tabla 1: Cuantificación de polifenoles totales

Extractos secos	[Polifenoles] µg equivalentes de catequina/ mg de extracto seco
<i>Melissa officinalis</i> Serie N° 069262.	25,5 ± 0,69
<i>Rosmarinus officinalis L</i> Serie N°049022.	110,1 ± 24,79

Las condiciones del ensayo están descritas en Métodos. Todos los valores representan el promedio de al menos cuatro experimentos independientes ± D.E

Lipoperoxidación microsómica

Extracto de melisa. Este extracto inhibió la lipoperoxidación microsómica de una forma concentración – respuesta (Figura 1). El efecto máximo anti-lipoperoxidativo ensayado fue 86,5% y se alcanzó con la concentración 150µg/0,5mg de proteína microsómica, la concentración de extracto más alta ensayada. De la curva semilogarítmica construida con los datos de % de lipoperoxidación residual *versus* el logaritmo de las concentraciones de extracto

de melisa se obtuvo el valor EC_{50} : 24,9 μ g, el cual representa la concentración de extracto de melisa capaz de inhibir el 50% la lipoperoxidación microsómica inducida por Cu^{2+} /ascorbato (Figura 2).

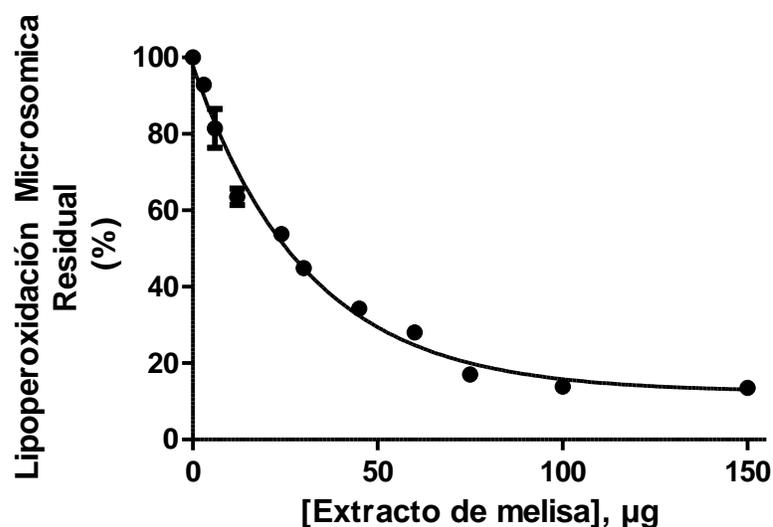


Figura 1: Efecto de melisa sobre la lipoperoxidación microsómica inducida por Cu^{2+} /ascorbato. Microsomas 0,5mg/mL fueron incubados durante 5 min con las distintas concentraciones del extracto de melisa (3-150 μ g) antes de adicionar el sistema Cu^{2+} /ascorbato para inducir la lipoperoxidación microsómica de acuerdo a lo descrito en Métodos. Los porcentajes de inhibición fueron calculados considerando como 100% el valor de la lipoperoxidación medida en presencia del sistema Cu^{2+} /ascorbato y en ausencia del extracto de melisa. Los valores representan el promedio de al menos cuatro experimentos independientes \pm E.E.

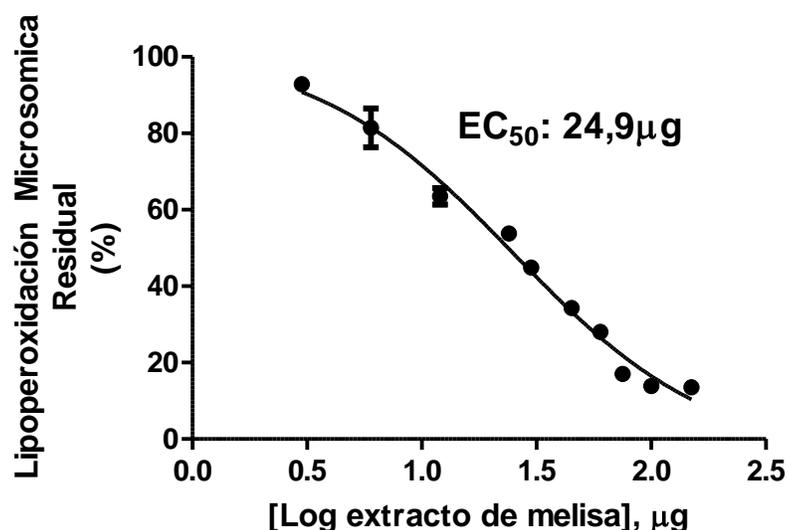


Figura 2: Curva semilogarítmica del efecto de melisa sobre la lipoperoxidación microsómica inducida por Cu^{2+} /ascorbato. Los porcentajes de inhibición y las concentraciones de extracto de melisa corresponden a los de la Figura 1. Los valores representan el promedio de al menos cuatro experimentos independientes \pm E.E.

Extracto de romero. La preincubación de los microsomas con el extracto de romero por 5min antes de adicionar el sistema pro-oxidante Cu^{2+} /ascorbato, inhibió la lipoperoxidación microsómica de una forma concentración – respuesta. El efecto anti-lipoperoxidante máximo ensayado, aproximadamente 100%, fue alcanzado con 20μg del extracto de romero/0,5mg de proteína microsómica (Figura 3). De la curva semilogarítmica construida con los datos de % de lipoperoxidación residual *versus* el logaritmo de las concentraciones de extracto de romero ensayadas se obtuvo el valor de EC_{50} : 3,9μg (Figura 4).

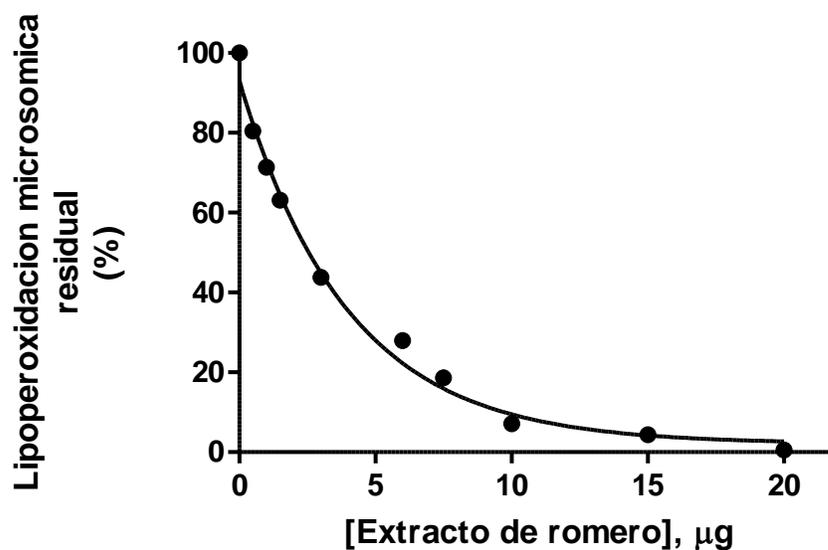


Figura 3: Efecto de romero sobre la lipoperoxidación microsómica inducida por Cu^{2+} /ascorbato. Microsomos hepáticos de rata (0,5mg/ml) incubados previamente durante 5min con distintas concentraciones de extracto de romero (0,5-20µg), para luego ser incubados con el sistema pro-oxidante. Los porcentajes de inhibición fueron calculados considerando como 100% el valor de la lipoperoxidación medida en ausencia de extracto de romero. Las condiciones del ensayo están descritas en Métodos. Los valores representan el promedio de al menos cuatro experimentos independientes \pm E.E.

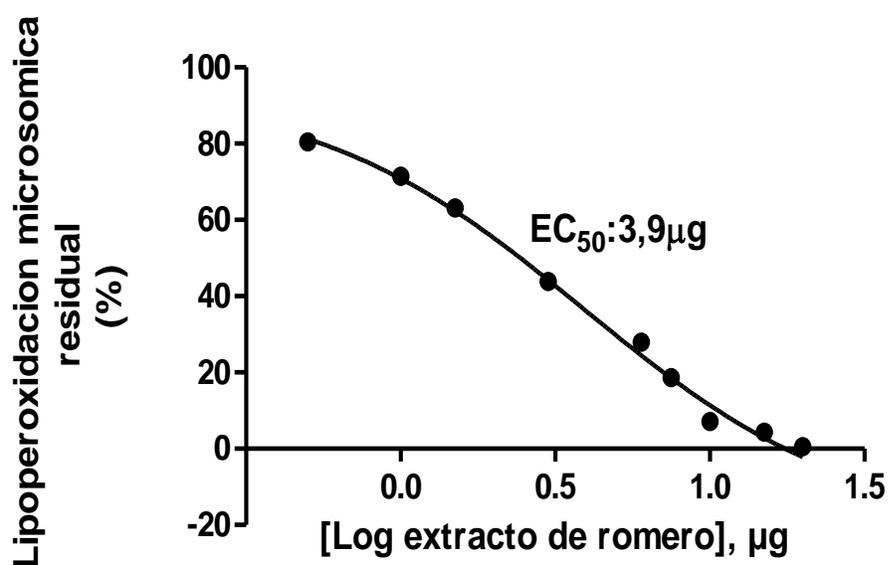


Figura 4: Curva semilogarítmica del efecto de romero sobre la lipoperoxidación microsómica inducida por Cu^{2+} /ascorbato. Los porcentajes de inhibición y las concentraciones de extracto de romero corresponden a los de la Figura 3. Los valores representan el promedio de al menos cuatro experimentos independientes \pm E.E.

Protección de tioles microsómicos

Extracto de melisa. La preincubación de los microsomas con el extracto de melisa por 5min antes de adicionar el sistema pro-oxidante Cu^{2+} /ascorbato, inhibió la pérdida de los tioles microsómicos de una forma concentración respuesta (figura 5). El rango de concentración de extracto utilizado fue $3\mu\text{g}$ a $54\mu\text{g}/0,5\text{mg}$ de proteína microsómica. Asimismo el menor % de inhibición observado en las condiciones de ensayo descritas en Métodos fue 8,6% y el mayor, 85,7%. El valor de EC_{50} calculado del gráfico directo (Figura 5) fue $27\mu\text{g}$.

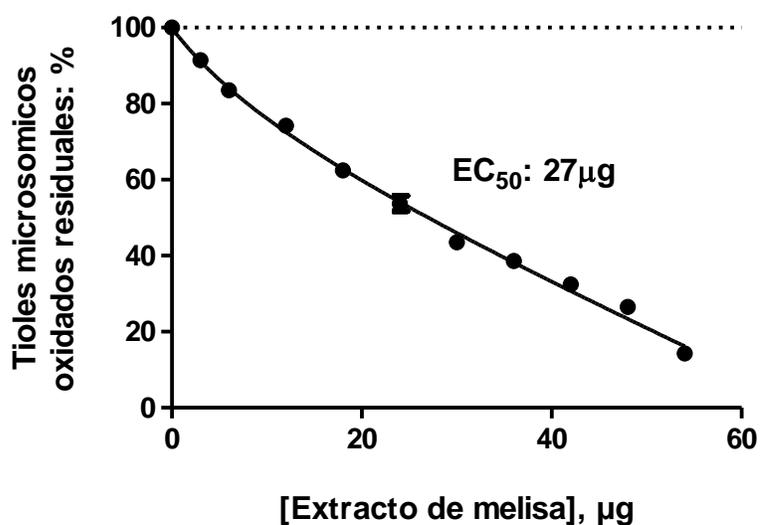


Figura 5: Efecto de extracto melisa sobre la oxidación de Tioles microsómicos inducido por sistema Cu^{2+} /ascorbato. Los microsomas ($0,5\text{mg}/\text{mL}$) fueron preincubados durante 5 min con las distintas concentraciones de melisa ($3\text{-}54\mu\text{g}$), antes de adicionar el sistema Cu^{2+} /ascorbato. Los porcentajes de tioles oxidados se obtuvieron considerando como 100% la diferencia entre los tioles determinados en ausencia y en presencia del sistema oxidante. La determinación se realizó de acuerdo a lo descrito en Métodos. Todos los valores representan el promedio de al menos cuatro experimentos independientes \pm E.E.

Extracto de romero. Similares resultados a los obtenidos en estos ensayos con el extracto de melisa, fueron obtenidos con el extracto de romero, es decir este último también inhibió la pérdida de los tioles microsómicos de una forma concentración respuesta (figura 6). El rango de concentración de extracto utilizado fue 2,7µg a 22µg/0,5mg de proteína microsómica. Asimismo, el menor % de inhibición observado en las condiciones de ensayo descritas en Métodos fue 3,2% y el mayor, 98,9%. El valor de EC_{50} calculado del gráfico directo fue 9,56µg. (Figura 6)

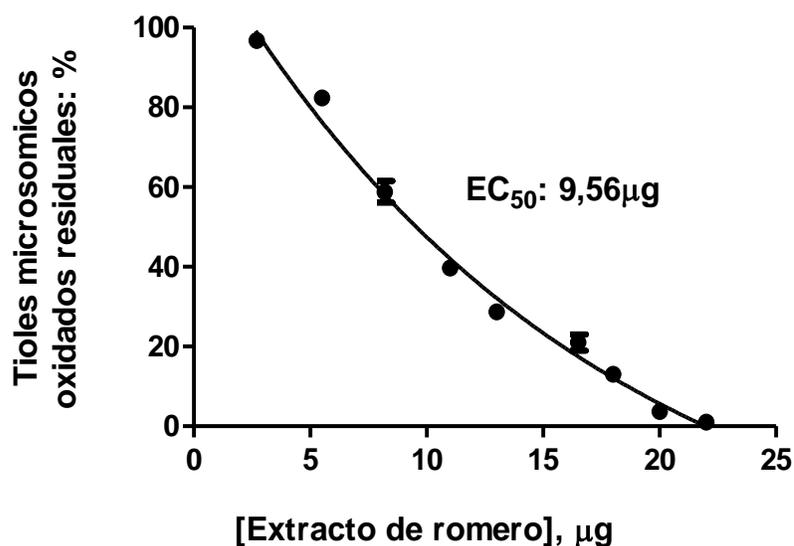


Figura 6: Efecto de extracto romero sobre la oxidación de Tioles microsómicos inducido por sistema Cu^{2+} /ascorbato. Los microsomas (0,5mg/mL) fueron preincubados durante 5 min con las distintas concentraciones de melisa (2,7-22µg), antes de adicionar el sistema Cu^{2+} /ascorbato. Los porcentajes de tioles oxidados se obtuvieron considerando como 100% la diferencia entre los tioles determinados en ausencia y en presencia del sistema oxidante. La determinación se realizó de acuerdo a lo descrito en Métodos. Todos los valores representan el promedio de al menos cuatro experimentos independientes \pm E.E.

Tioles microsómicos en presencia de Cu^{2+} . Dado que la membrana microsómica contiene proteínas tiólicas (GSH-transferasa, monooxigenasa CYP450, UDP-glucuroniltransferasa, etc.). La presencia de iones cobre en concentración μM podría afectar a estas proteínas por la capacidad del azufre tiólico de quelar estos iones. Es por ello que se incubaron microsomas con CuSO_4 $50\mu\text{M}$ durante 30 min a 37°C y luego 60 min con DTNB $0,3\text{mM}$ para cuantificar los grupos tiólicos presentes en esta membrana.

Como se esperaba, los iones cobre provocaron una disminución del contenido total de tioles de aproximadamente un 80%. La adición de $50\mu\text{g}$ y $100\mu\text{g}$ de los extractos de melisa y romero previnieron esta disminución, siendo el efecto de romero el mayor, alcanzando el máximo aumento de los tioles microsómicos residuales desde aproximadamente 20% a un 50% con la concentración $100\mu\text{g}$ de romero/ $250\mu\text{g}$ de proteína microsómica (Figura 7).

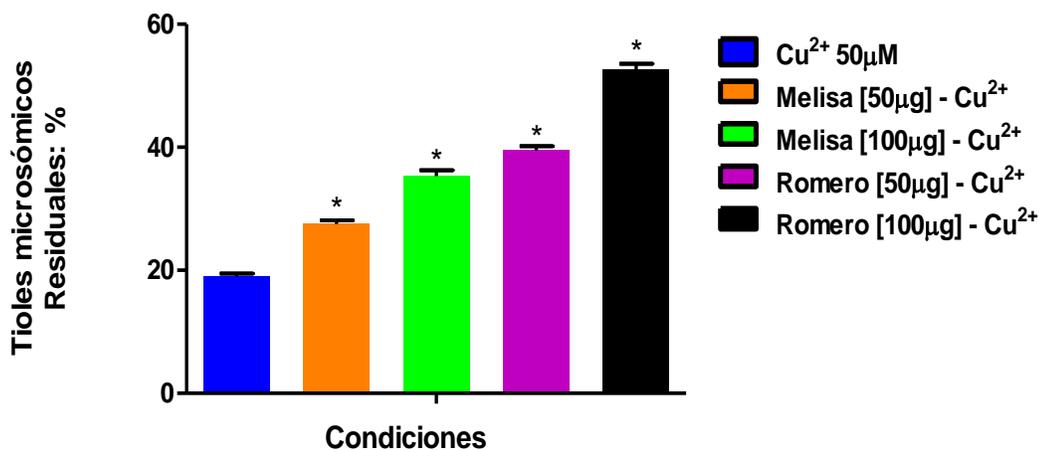


Figura 7: Tioles Microsómicos en presencia de Cu²⁺. Microsomas hepáticos de rata (0,25mg de proteína microsómica/mL); CuSO₄ 50µM. Las condiciones del ensayo están descritas en Métodos. Todos los valores representan el promedio de al menos cuatro experimentos independientes ± E.E. *: Valores significativamente diferentes a Cu²⁺ 50µM; p<0,05.

Espectro de absorbancia del Cu^{2+} en presencia de los extractos de melisa y romero

Extracto de melisa. La solución de CuSO_4 0,5mM (control) presentó un pico de absorbancia a 241nm. Al adicionar a esta solución extracto de melisa (300 μg y 500 μg) el pico de absorbancia del ión Cu^{2+} a 241nm se mantuvo pero apareció un nuevo pico a 370nm (Figura 8). Más aún, el máximo de absorbancia del pico a 370nm, parece depender de la concentración de melisa adicionada a la solución de CuSO_4 0,5mM: la relación entre las absorbancias máximas obtenidas al adicionar 300 y 500 μg del extracto ($300/500 = 0,6$) fue $0,138/0,215 = 0,64$ (Tabla 2).

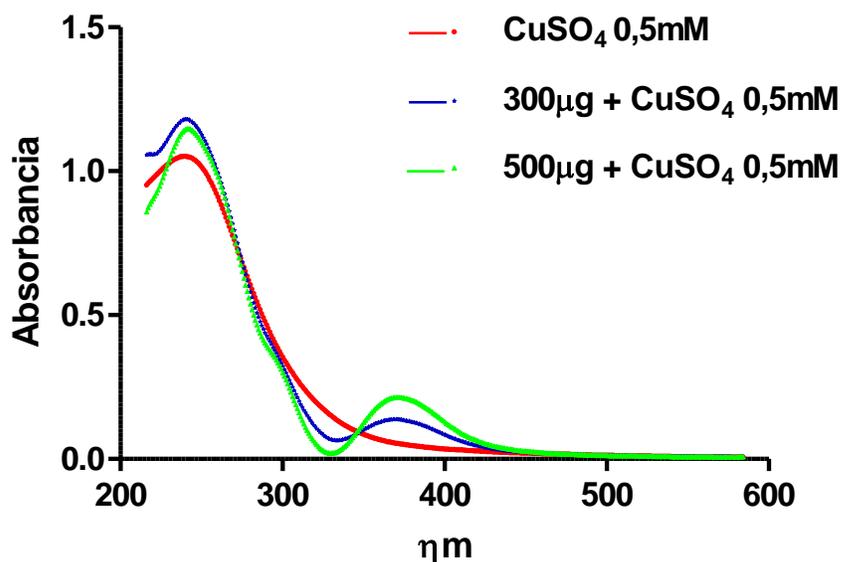


Figura 8: Espectro de absorbancia de la solución de CuSO_4 0,5mM en presencia de extracto melisa. Espectro experimental.

Tabla 2. Absorbancia máxima de CuSO₄ en presencia de melisa

Longitud de onda	241nm	370nm
CuSO ₄	1,116 ± 0,065	-----
Melisa 300µg + CuSO ₄	1,181 ± 0,008	0,138 ± 0,006
Melisa 500µg + CuSO ₄	1,148 ± 0,003	0,215 ± 0,005

CuSO₄: 0,5mM. Los valores representan el promedio de al menos cuatro determinaciones independientes ± D.E.

Extracto de romero. Como se menciona anteriormente, la solución de CuSO₄ 0,5mM (control) presentó un pico de absorbancia a 241nm. Al adicionar a esta solución el extracto de romero (300 y 500µg) el pico de absorbancia a 241nm disminuyó y aparecieron nuevos picos a 292nm, 384nm y 434nm (Figura 9). El máximo de absorbancia del pico a 241nm como también de los nuevos picos parece depender de la concentración de romero adicionada a la solución de CuSO₄ 0,5mM. Así, la relación entre las absorbancias máximas a 241nm obtenidas al adicionar 300 y 500µg del extracto ($500/300 = 1,7$) fue $0,849/0,496 = 1,7$ (Tabla 3).

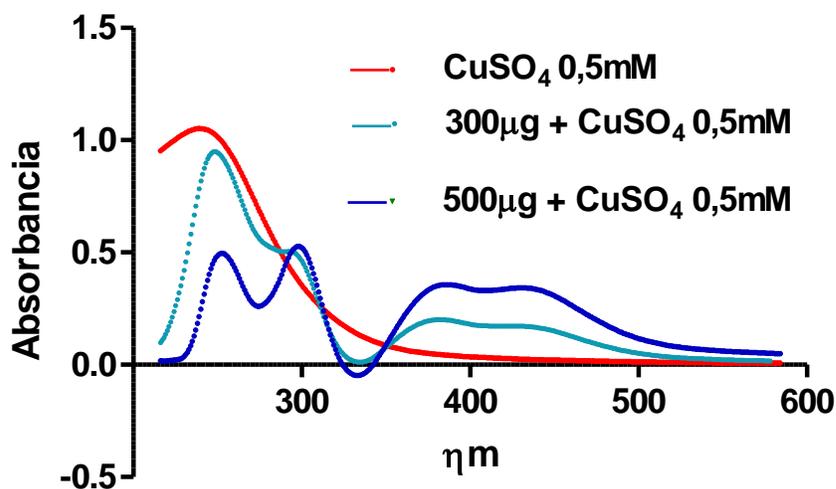


Figura 9: Espectro de absorción de la solución de CuSO_4 0,5mM en presencia de extracto de romero. Espectro experimental.

Tabla 3. Absorbancia máxima de CuSO_4 en presencia de romero

Longitud de onda	241nm	292nm	384nm	434nm
CuSO_4	$1,051 \pm 0,065$	-----	-----	-----
Romero 300μg + CuSO_4	$0,849 \pm 0,008$	$0,506 \pm 0,008$	$0,201 \pm 0,002$	$0,171 \pm 0,003$
Romero 500μg + CuSO_4	$0,496 \pm 0,003$	$0,528 \pm 0,008$	$0,351 \pm 0,004$	$0,342 \pm 0,005$

CuSO_4 : 0,5mM. Los valores representan el promedio de cuatro experimentos independientes \pm D.E.

N-desmetilación de aminopirina. Esta reacción es catalizada por el sistema citocromo P450 microsómico. Para cuantificar el HCHO, producto de esta reacción, al final de la reacción la mezcla se trató con 2,4-pentandiona formándose un conjugado de color amarillo que absorbe a 414nm (Figura 10). La linealidad del método se determinó realizando una curva estándar que se muestra en la Figura 10.

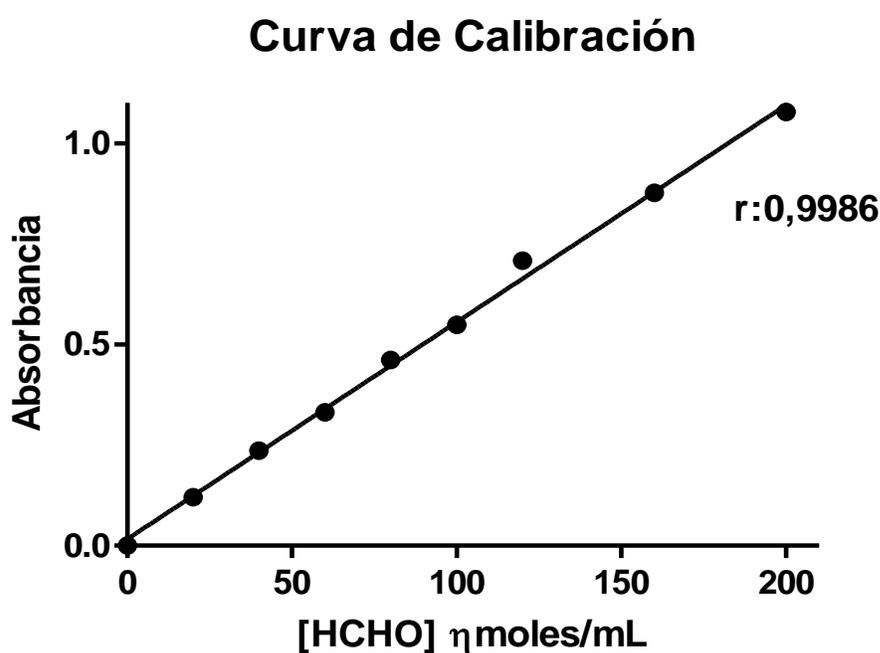


Figura 10: Curva de calibración formaldehído. Los valores representan el promedio de al menos cuatro experimentos independientes \pm E.E.

Los resultados mostraron que al adicionar el extracto de melisa a la mezcla que contenía microsomas, aminopirina y NADPH, la actividad N-desmetilante del sistema CYP450 disminuyó. La actividad control medida en ausencia de extracto fue 3,5 η m de HCHO/min/mg de proteína; en presencia de melisa, 2,7 η m de HCHO/min/mg de proteína y en presencia de romero, 2,0 η m de HCHO/min/mg de proteína (Figura 11).

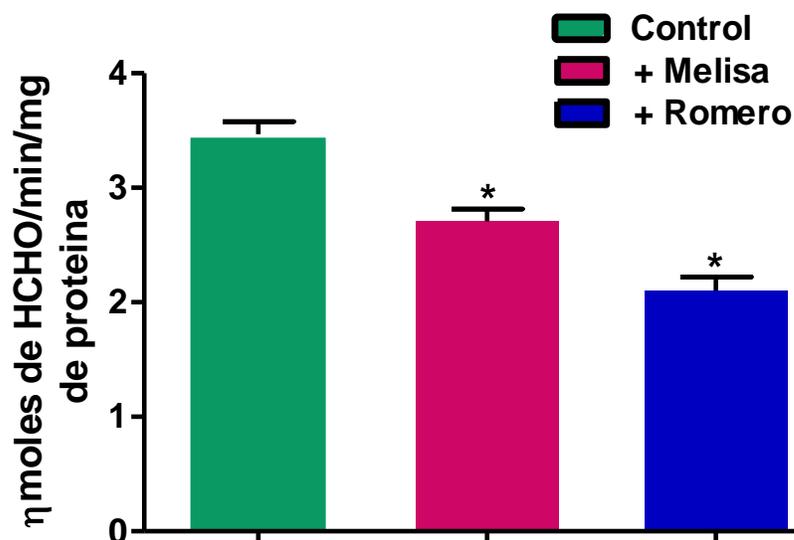


Figura 11: N- desmetilación de aminopirina a través del sistema citocromo P450. Microsomas 2mg/mL fueron incubados con aminopirina 2mM; sistema generador de NADPH constituido por glucosa-6-fosfato 6mM, NADP 0,6mM y glucosa-6-fosfato deshidrogenasa 5,0 Unidades [melisa]: 50µg/mg de proteína microsómica; [romero]: 50µg/mg de proteína microsómica. Las condiciones del ensayo están descritas en Métodos. Los valores representan el promedio de al menos cuatro experimentos independientes \pm E.E. *: Valores significativamente diferentes al control; $p < 0,05$.

Resumen de resultados. El análisis global de los resultados obtenidos en los ensayos de lipoperoxidación microsómica, oxidación de tioles microsómicos, tioles microsómicos en presencia de Cu^{2+} y la actividad N-desmetilante de aminopirina del sistema CYP450 se muestran en la Tabla 4. En ella se observa que la capacidad antilipoperoxidante como también la de prevenir la oxidación de los tioles proteicos microsómicos fue significativamente mayor en presencia del extracto de romero respecto del de melisa, 6,4 y 2,8 veces superior, respectivamente. Asimismo, la disminución de los tioles microsómicos provocada por la presencia de iones Cu^{2+} fue también prevenida mayoritariamente por el extracto seco de romero, 1,5 veces superior.

Como una forma indirecta de medir la lipofilicidad de los compuestos presentes en los extractos herbales ensayados, se determinó la actividad N-desmetilante del sistema CYP450, el cual se caracteriza por biotransformar xenobióticos lipofílicos. Nuevamente el extracto de romero inhibió mayoritariamente esta actividad enzimática; la disminución fue 1,4 veces superior para romero respecto del comportamiento de melisa.

Tabla 4. RESUMEN DE RESULTADOS

LIPOPEROXIDACIÓN MICROSÓMICA		
	EC₅₀	[Polifenoles] presentes en la Concentración de extracto EC₅₀
Melisa	24,9	0,63
Romero	3,9	0,43
OXIDACIÓN DE TIOLES MICROSÓMICOS		
	EC₅₀	[Polifenoles] presentes en la Concentración de extracto EC₅₀
Melisa	27	0,69
Romero	9,56	1,05
TIOLES MICROSÓMICOS EN PRESENCIA DE IONES Cu²⁺		
	Tioles microsómicos: %	
Microsommas	100	
Microsommas + Cu²⁺	19,0	
Microsommas + Cu²⁺ + melisa [100µg]	35,3	
Microsommas + Cu²⁺ + romero [100µg]	52,6	
ACTIVIDAD N-DESMETILANTE DE AMINOPIRINA (CYP450)		
	V: ηmoles de HCHO formados /min/mg de proteína	Relación Extracto/Control
Control	3,5	----
Melisa	2,7	0,77
Romero	2,0	0,57

IV. DISCUSION

Diversos estudios, como también la medicina nativa, han mostrado que preparados de hojas de *Melissa officinalis* (melisa)^[26] y *Rosmarinus officinalis* (romero)^[23] presentan efectos psicotrópicos. Esto implica que probablemente existen en dichos preparados sustancias lipofílicas capaces de atravesar la barrera hemato-encefálica. Por otra parte, se ha demostrado que las enfermedades neurodegenerativas están asociadas a estrés oxidativo. Este fenómeno se debería a un aumento de las concentraciones de iones de hierro y cobre en las neuronas afectadas^[4], los cuales en su estado reducido generan especies reactivas del oxígeno. Es por ello que en este trabajo se caracterizó la actividad antioxidante de los extractos secos estandarizados de melisa y romero. Al respecto, ambos preparados fueron capaces de inhibir la lipoperoxidación microsómica inducida por el sistema Cu^{2+} /ascorbato, siendo el extracto de romero el más eficaz; su EC_{50} fue aproximadamente 6 veces menor que el de melisa (Figuras 1, 2, 3 y 4). Esta diferencia podría explicarse al menos en parte, por el contenido de polifenoles 4 veces mayor del extracto de romero respecto del de melisa (Tabla 1). Cabe señalar además, que el extracto de romero también inhibió mayoritariamente la N-desmetilación de aminopirina, ensayo que se utilizó como una forma indirecta de determinar la presencia de compuestos lipofílicos en los extractos de melisa y romero. Por otra parte, ambos extractos fueron capaces de prevenir la oxidación de los tioles microsómicos inducida por el sistema Cu^{2+} /ascorbato (Figuras 5 y 6), y al igual que en la lipoperoxidación, el efecto antioxidante del extracto de romero fue mayor que el del extracto de melisa, en este caso aproximadamente 3 veces superior.

Como una forma de evaluar la capacidad de los extractos de quelar iones metálicos, inhibiendo así la generación de estrés oxidativo, se preincubaron microsomas hepáticos con CuSO_4 50 μM y se cuantificaron los tioles

microsómicos en ausencia y presencia de los extractos. Ambos extractos fueron capaces de prevenir la disminución de los tioles microsómicos provocada por los iones Cu^{2+} y nuevamente el efecto provocado por el extracto de romero fue aproximadamente 1,5 veces mayor que el del extracto de melisa (Figura 7). Como una forma de corroborar el efecto quelante de iones cobre de estos extractos, se evaluó la capacidad de ellos de modificar el espectro de absorbancia de una solución de CuSO_4 . Como se muestra en las Figuras 8 y 9, efectivamente ambos extractos modificaron dicho espectro; los cambios en las absorbancias modificadas fueron mayores en presencia del extracto de romero como se muestra en las Tablas 2 y 3. Estos resultados apoyan nuestro postulado el cual señala que la quelación de iones Cu^{2+} por residuos aminoacídicos de las proteínas microsómicas puede ser prevenido por los extractos de melisa y romero, los cuales contienen, entre otros, compuestos polifenólicos de reconocida actividad quelante, siendo éste uno más de los mecanismos a través de los cuales estos compuestos ejercen su capacidad antioxidante.

Las diferencias en la capacidad redox entre el extracto de romero y el de melisa, no sólo podrían estar dadas por sus diferencias en el contenido de polifenoles totales que en este caso favorecen al extracto de romero. Este contenido fue 4 veces superior para el extracto seco de romero respecto de melisa; sin embargo, aunque todas las actividades medidas favorecieron al extracto de romero, las diferencias entre ambos extractos fueron superiores e inferiores a 4, resultados que se observan en la Tabla 4. Estos antecedentes parecen indicar que las propiedades físico-químicas de los principios activos, entre ellas la lipofilidad, probablemente juega un rol importante, dado que las biomoléculas en este estudio están contenidas en una membrana celular. Como una forma indirecta de evaluar esta propiedad se ensayó la capacidad de estos extractos de inhibir la N-desmetilación de aminopirina, reacción catalizada por el

sistema CYP450, el cual cataliza la oxidación de compuestos lipofílicos. Ambos extractos inhibieron esta actividad enzimática siendo el extracto de romero el que provocó la mayor inhibición, 40% contra 23% de inhibición provocada por el extracto de melisa (Figura 11). Esto estaría indicando mayor contenido de compuestos lipofílicos en el extracto de romero, que incluyen polifenoles.

Desde el punto de vista biológico, un fármaco antioxidante es aquel capaz de mostrar sus efectos antioxidantes celulares a bajas concentraciones (concentraciones μ molares). Además de la concentración de principios antioxidantes, se deben considerar las propiedades físico-químicas de los mismos, ya que el organismo posee compartimentos lipofílicos (membranas), como también, polares (sangre, citosol), en los cuales se distribuyen los fármacos. Como se mencionó en la introducción, preparados de melisa^[22,26] y romero^[23] se utilizan como ansiolíticos, antidepresivos y sedantes, todos ellos efectos psicotrópicos. De aquí la importancia de los resultados obtenidos en este trabajo, los cuales no sólo dicen relación con la capacidad antioxidante de los extractos ensayados, sino además, de los posibles mecanismos involucrados en dicha actividad y de la presencia de compuestos lipofílicos en ellos, posiblemente antioxidantes lipofílicos. Este último punto quedó avalado por el efecto inhibitorio sobre la biotransformación oxidativa de aminopirina a través del sistema CYP450 provocada por ambos extractos herbales (Figura 11). Cabe destacar que los niveles de antioxidantes no enzimáticos lipofílicos (alfa – tocoferol) en la célula animal comparados con los polares son muy bajos^[32]. Más aún, la administración de dosis altas de estos antioxidantes puede inducir toxicidad aguda^[33].

Dadas las propiedades farmacológicas que se relacionan con los efectos psicotrópicos y la actividad antioxidante de principios activos presentes en los extractos de melisa y romero, ellos podrían ser utilizados como fitofármacos en el tratamiento de enfermedades neurodegenerativas. Más aún, los mecanismos

a través de los cuales los extractos de melisa y romero ejercen su acción farmacológica pueden potenciar los efectos de los fármacos sintéticos en uso, disminuyendo con ello las reacciones adversas y el rechazo de los pacientes a estos fármacos. Más aún, la disminución en las dosis de los fármacos sintéticos, conduciría a un ahorro tanto monetario como a una mejoría en la calidad de vida de los pacientes. Por lo tanto, estos resultados, aunque preliminares, abren nuevas expectativas para formular fitofármacos orientados a apoyar las terapias utilizadas frente a enfermedades neurodegenerativas, cada vez de mayor incidencia en la población mundial.

V. REFERENCIAS

- [1] Donoso A, Venegas P, Villarroel C y Vásquez C. Deterioro cognitivo leve y enfermedad de alzheimer inicial en adultos mayores. Rev. Chil. Neuro-Psiquiat. 39: 231-238, 2001.
- [2] Melo A, Monteiro L, Lima MFR, De Oliveira DM, De Cerqueira MD, El-Bachá RS. Oxidative Stress in Neurodegenerative Diseases: Mechanisms and therapeutic Perspectives. Oxidative Medicine and Cellular Longevity. Volume 2011: 14 pages, Hindawi Publishing Corporation. ID 467180. doi:10.1155/2011/467180, 2011.
- [3] Halliwell B, Gutteridge JMC. Role of radicals and catalytic metal ions in human disease, Methods Enzymol.186: 1 – 85, 1990.
- [4] Rivera-Mancía S, Pérez-Neri I, Ríos C, Tristán-López L, Rivera-Espinosa L, Montes S. The transition metals copper and iron in neurodegenerative diseases. Chem. Biol. Interact. 186: 184–199, 2010.
- [5] Letelier M.E, Lepe AM, Faúndez M, Salazar J, Marín R, Aracena P, Speisky H. Possible mechanisms underlying copper – induced damage in biological membranes leading to cellular toxicity. Chem. Biol. Interact. 151: 71 – 82, 2005.
- [6] Halliwell B, Gutteridge JMC. Oxford University Press, Oxford/ New York, F.R.B.M, 2007.
- [7] Di Matteo V, Pierucci M, Di Giovanni G, Esposito E. Oxidative Stress and Neurodegenerative Disorders, Chapter 27: Prevention and therapy of neurodegenerative disorders; Role of nutritional antioxidants. Pages: 621–661, 2007.

- [8] Behl C and Moosmann B. Serial. Causes and Consequences of Oxidative Stress in Alzheimer's Disease/Antioxidant neuroprotection in Alzheimer's disease as preventive and therapeutic approach. *F.R.B.M*, Vol. 33 (2): 182–191, 2002.
- [9] M. McCune L, Johns T. Antioxidant activity in medicinal plants associated with the symptoms of diabetes mellitus used by the Indigenous Peoples of the North American boreal forest. *J. Ethnopharmacol.* 82: 197 – 205, 2002.
- [10] Goodman M, Bostick RM, Kucuk O, Jones DP. Clinical trials of antioxidants as cancer prevention agents: Past, present, and future. *F.R.B.M*, 5: 1068–1084, 2011.
- [11] Benzie IF. Evolution of antioxidant defence mechanisms. *Eur. J. Nutr.* 39: 53-61, 2000.
- [12] Deneke SM. Thiol-based antioxidants. *Curr. Top. Cell. Regul.* 36: 151-180, 2000.
- [13] Bors W, Michel C. Chemistry of the antioxidant effect of polyphenols. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 957: 57-69, 2002.
- [14] Fraga CG, Galleano M, Verstraeten SV, Oteiza PI. Basic Biochemical mechanisms behind the health benefits of polyphenols. *Mol. Aspects Med.* 31: 435-445, 2010.
- [15] Sies H. Polyphenols and health: update and perspectives. *Arch. Biochem. Biophys.* 501: 2-5, 2010.
- [16] Forman HJ, Zhang H, Rinna A. Glutathione: Overview of its protective roles, measurement, and biosynthesis. *Mol. Aspects Med.* 30: 1–12, 2009.

- [17] Lo Pachin RM, Barber DS. Synaptic cysteine sulfhydryl groups as targets of electrophilic neurotoxicants. *Toxicol. Sci.* 94: 240-255, 2006.
- [18] Van Welie RT, Van Dijck RG, Vermeulen NP, Van Sittert NJ. Mercapturic acids, protein adducts, and DNA adducts as biomarkers of electrophilic chemicals. *Crit. Rev. Toxicol.* 22: 271-306, 1992.
- [19] Coles BF, Kadlubar FF. Detoxification of electrophilic compounds by glutathione S-transferase catalysis: determinants of individual response to chemical carcinogens and chemotherapeutic drugs?. *Biofactors* 17: 115-130, 2003.
- [20] Armstrong RN. Structure, catalytic mechanism, and evolution of the glutathione transferases. *Chem. Res. Toxicol.* 10: 2-18, 1997.
- [21] Rinaldi R, Eliasson E, Swedmark S, Morgenstern R. Reactive intermediates and the dynamics of glutathione transferases. *Drug. Metab. Dispos.* 30: 1053-1058, 2002.
- [22] Kennedy D.O, Scholey AB, Tildesley N.T.J, Perry E.K, Wesnes K.A. Modulation of mood and cognitive performance following acute administration of *Melissa officinalis* (lemon balm). *Pharmacol. Biochem. Behav.* 72: 953–964, 2002.
- [23] Machado DG, Bettio L.E.B, Cunha MP, Capra JC, Dalmarcob JB, Pizzolatti MG, Rodrigues ALS. Antidepressant-like effect of the extract of *Rosmarinus officinalis* in mice: Involvement of the monoaminergic system. *Progr. Neuro. Psychopharmacol. Biol. Psychiatr.* 33: 642–650, 2009.
- [24] Organización mundial de la salud. Tratamiento farmacológico de los trastornos mentales en la atención primaria de salud.

- [25] Plantas medicinales y aromáticas evaluadas en Chile – Resultados de proyectos impulsados por el FIA. Fundación para la innovación agraria. Ministerio de Agricultura., Santiago de Chile, 2003.
- [26] Abuhamdah S, Chazota PL. Lemon Balm and Lavender herbal essential oils: Old and new ways to treat emotional disorders? *Curr. Anaesth. Crit. Care* 19: 221–226, 2008.
- [27] Letelier ME, Terán A, Barra MA, Aracena – Parks P. Antioxidant properties of *Rosmarinus officinalis* and its effects on xenobiotic biotransformation. *Bol. Latinoam. Caribe Plant. Med. Aromat.* 8(6): 487-497, 2009.
- [28] Letelier ME, Sánchez-Jofré S, Peredo-Silva L, Cortés-Troncoso J, Aracena-Parks P. Mechanisms underlying iron and copper ions toxicity in biological systems: Pro-oxidant activity and protein-binding effects. *Chem. Biol. Interact.* 188: 220–227, 2010.
- [29] O.H. Lowry, N.J. Rosebrough, A.L. Farr, R.J. Randall, Protein measurement with the Folin phenol reagent, *J. Biol. Chem.* 193 (1): 265–275, 1951.
- [30] Letelier ME, Molina-Berrios A, Cortés-Troncoso J, Jara-Sandoval J, Holst M, Palma K, Montoya M, Miranda D, González-Lira V. DPPH and oxygen free radicals as pro-oxidant of biomolecules. *Toxicol. In Vitro* 22: 279-286, 2008.
- [31] Letelier ME, Cortés-Troncoso J, Lepe AM, Jara-Sandoval J, Molina-Berrios A, Rodriguez C, Iturra- Monrecinos P, Faúndez M. Evaluation of the antioxidant properties and effects on the biotransformation of commercial herbal preparations using rat liver endoplasmic reticulum. *Bol. Latinoam. Caribe Plant. Med. Aromat.* 8(2): 110 – 120, 2009.

- [32] Entrala Bueno A. Vitaminas. Aspectos prácticos en medicina. Ediciones Díaz de Santos, 1995.
- [33] Bronstein AC, Spyker DA, Cantilena LR, Green, JL, Rumack BH. Dart RC. "2010 Annual Report of the American Association of Poison Control Centers' National Poison Data System (NPDS): 28th Annual Report". *Clinical Toxicol.* 49 (10): 910–941, 2011.