



Universidad de Chile
Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas
Departamento de Química Farmacológica y Toxicológica
Laboratorio de Farmacología y Toxicología

**CAPACIDAD ANTIOXIDANTE BIOLÓGICA DE EXTRACTOS
HIDROALCOHÓLICOS DE HOJAS DE *Thymus vulgaris* Y DE *Hypericum
perforatum***

Director

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

Patrocinante

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

Memoria para optar al título de Químico Farmacéutico

ANDREA PAZ SARAVIA DOIZI

Santiago de Chile

2014

***A mi madre Luz María,
sin ti nada sería posible.***

**Desde la base me alzare al cielo.
No cambiando,
y consiente de la distancia entre mi cabeza a mi corazón,
y hasta mis pies.
*(Mariano Bollo M.)***

Agradecimientos

Agradezco a Dios por sobre todas las cosas, por siempre guiar mi camino en pos del bien.

A mi querida madre Luz María Doizi por su esfuerzo, amor, apoyo y entrega infinita, este logro es nuestro. Te amo.

A mi padre del corazón, Mariano Bollo M, gracias por siempre guiarme, antes y después, pero siempre. Lejos o cerca estuviste y sé que estarás. No sería lo que soy hoy si no fuera por ti. Un beso a la distancia.

A mi amor, Hugo Soto N. por estar siempre a mi lado apoyándome, aguantándome y amándome.

A mis hermanos, Mariano y María Victoria, gracias por estar conmigo y siempre hacerme reír, los adoro.

A mi Mami Mercedes, por su preocupación y cariño entregado por siempre.

A mi abuela Nora, por su cariño y apoyo.

A Carola, Jorge A, Sebastián, Anais, Marilyn, Tía Elba, Tío Jorge O, Francisca, Alexander, Samuel, Jorge Andrés, Tía Luisa, Tía Sabina, Nene e Ivonne por el apoyo y el cariño entregado toda la vida.

A Francisco Ormazábal por su amistad, cariño y apoyo durante estos años, por fin lo logramos.

A Sebastián Perry por ser siempre mi confidente y amigo.

A Javier Castro, gracias por el apoyo y por esos años llenos de alegría.

A la Familia Soto Núñez, gracias por el apoyo, la ayuda y el cariño que me brindaron todos estos años.

A Don José por su ayuda desinteresada durante este largo año, sin usted no habría sido lo mismo.

Al Dr. Mario Faúndez por su excelente disposición cada vez que lo necesitamos. A la Dra. Ximena Polanco por la donación de los extractos.

Y por último, a mi Querida Profesora Maria Eugenia Letelier, gracias por apoyarme, a pesar de la adversidad, en este gran desafío. Gracias por su dedicación y su sabio consejo. Siempre será una persona importantísima en mi vida.

ABREVIATURAS

1-Cl-2,4-DNB	: 1-cloro-2,4-dinitrobenceno
BSA	: Albúmina sérica bovina
DTNB	: Ácido 5,5'-ditio- <i>bis</i> (2-nitrobenzoico)
GST	: Glutación transferasa
ROS	: Sustancias reactivas de oxígeno
TBA	: Ácido tiobarbitúrico.
TBARS	: Sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico
TCA	: Ácido tiocloroacético
UA	: Unidades de absorbancia.

INDICE GENERAL

	<i>Página</i>
DEDICATORIA.....	II
AGRADECIMIENTOS.....	III
ABREVIATURAS.....	V
ÍNDICE GENERAL.....	VI
ÍNDICE DE FIGURAS.....	VIII
INDICE DE TABLAS.....	X
RESUMEN.....	XI
SUMMARY.....	XII
I. INTRODUCCIÓN.....	1
Hipótesis.....	11
Objetivos generales.....	11
Objetivos específicos.....	11
II. MATERIALES Y MÉTODOS.....	12
Reactivos.....	12
Animales de experimentación.....	12
Preparación de microsomas hepáticos de rata.....	12
Cuantificación de polifenoles.....	13
Condiciones oxidativas.....	14
Lipoperoxidación microsómica.....	14
Determinación de tioles microsomales.....	15
Actividad GSH-transferásica microsómica.....	16
Quelación de Cu ⁺²	16
Análisis estadístico.....	17

III. RESULTADOS.....	18
Polifenoles totales de los extractos herbales.....	18
Prevención de la lipoperoxidación microsómica.....	18
Prevención de la oxidación de tioles microsómicos.....	23
Reversión de la oxidación de tioles microsómicos.....	27
Actividad GSH-transferásica microsómica en presencia de los extractos herbales	31
Capacidad quelante de Cu^{+2} de los extractos herbales.....	36
IV. DISCUSIÓN.....	37
V. CONCLUSIÓN.....	41
VI. PROYECCIONES.....	41
VI. REFERENCIAS.....	43

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura N°		Página
1	<i>Thymus vulgaris</i>	1
2	Flavonas de <i>Thymus vulgaris</i>	3
3	<i>Hypericum perforatum</i>	4
4	Principales compuestos bioactivos de <i>Hypericum perforatum</i>	5
5	Catequina	13
6	Formación del conjugado coloreado en la técnica de lipoperoxidación microsómica	14
7	Lipoperoxidación microsómica inducida por el sistema Fe ⁺³ /ascorbato en presencia de los extractos herbales	20
8	Gráficos semilogarítmicos de la lipoperoxidación microsómica inducida por el sistema Fe ⁺³ /ascorbato en presencia de los extractos herbales	21
9	EC ₅₀ de la lipoperoxidación microsómica vs la concentración de los polifenoles de los extractos	22
10	Prevención de la oxidación de los tioles microsómicos inducida por el sistema Fe ⁺³ /ascorbato en presencia de los extractos herbales	24
11	Gráficos semilogarítmicos de la prevención de la oxidación de tioles inducida por el sistema Fe ⁺³ /ascorbato en presencia de los extractos herbales	25

12	EC ₅₀ de la prevención de la oxidación de tioles <i>versus</i> la concentración de polifenoles de los extractos	26
13	Reversión de la oxidación de tioles microsómicos inducida por el sistema Fe ⁺³ /ascorbato en presencia de los extractos herbales	28
14	Gráficos semilogarítmicos de la reversión de la oxidación de tioles microsómicos inducida por el sistema Fe ⁺³ /ascorbato en presencia de los extractos herbales	29
15	EC ₅₀ de la reversión de la oxidación de tioles <i>versus</i> la concentración de polifenoles de los extractos	30
16	Gráfico experimental de la actividad GSH-transferásica microsómica en presencia de Tomillo	32
17	Gráfico experimental de la actividad GSH-transferásica microsómica en presencia de Hierba de San Juan.	32
18	Gráfico experimental de la actividad GSH-transferásica microsómica en presencia de Hierba de San Juan y de Tomillo	33
19	Inhibición de la actividad GSH-transferásica <i>versus</i> reversión de la oxidación de tioles microsómicos	34
20	Modificación del espectro de absorbancia de Cu ⁺² en presencia de los extractos herbales	36

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla N°		Página
1	Polifenoles totales	17
2	Comparación de los EC ₅₀ de la lipoperoxidación microsómica	21
3	Comparación de los EC ₅₀ de los extractos de Tomillo y Hierba de San Juan obtenidos en la prevención de la oxidación de tioles microsómicos inducida por el sistema Fe ⁺³ /ascorbato.	25
4	Comparación de los EC ₅₀ de los extractos de Tomillo y Hierba de San Juan obtenidos en la reversión de la oxidación de los tioles microsómicos inducida por el sistema Fe ⁺³ /ascorbato	29
5	Valores de las pendientes y velocidad de reacción de formación del conjugado GSH-DNB en presencia de los extractos herbales	33
6	Razón entre la reversión de la oxidación de tioles microsómicos y la Actividad GST.	35

CAPACIDAD ANTIOXIDANTE BIOLÓGICA DE EXTRACTOS HIDROALCOHÓLICOS DE HOJAS DE *Thymus vulgaris* Y DE *Hypericum perforatum*

Thymus vulgaris (Tomillo) e *Hypericum perforatum* (Hierba de San Juan), plantas originarias de Europa, Asia y África del Norte, han sido utilizadas extensamente en afecciones respiratorias y trastornos depresivos, respectivamente. Dado el potencial terapéutico de estas especies y considerando que todas las enfermedades, en mayor o menor medida, están asociadas a estrés oxidativo, en este trabajo se estudió la capacidad antioxidante de extractos hidroalcohólicos de hojas de *Thymus vulgaris* e *Hypericum perforatum*. Ambos extractos previnieron, con diferente magnitud, la lipoperoxidación microsómica, previnieron y revirtieron la oxidación de los tioles microsómicos, todos éstos fenómenos inducidos por el sistema pro-oxidante Fe^{+3} /ascorbato. Estos extractos además fueron capaces de quelar iones Cu^{+2} , actividad medida por el cambio del espectro de absorbancia de este ión en presencia de los extractos. Más aún, los extractos testeados inhibieron la GSH-transferasa microsómica, enzima cuya forma activa es el dímero -S-S-. Previamente se determinó la concentración de polifenoles para cada extracto para ser utilizada como marcador de la capacidad antioxidante. Los resultados obtenidos indicarían que las actividades no solo dependen del contenido de polifenoles si no que, más bien, a diferencias en la lipofilicidad de los agentes antioxidantes presentes en ambos extractos, propiedad que favorecería la afinidad por la membrana microsómica. Por otra parte, también es probable que existan diferencias en los potenciales redox de los antioxidantes herbales favoreciendo a aquellos presentes en el extracto de Tomillo. Estas consideraciones se discuten al final del manuscrito en términos de su importancia farmacológica.

BIOLOGICAL ANTIOXIDANT CAPACITY OF HYDROALCOHOLIC EXTRACTS FROM *Thymus vulgaris* AND *Hypericum perforatum* LEAVES

Thymus vulgaris and *Hypericum perforatum*, plants native from Europe, Asia and North Africa, have been used extensively in respiratory and depressive disorders, respectively. Considering the therapeutic potential of these species and that all diseases, some extent, are associated to oxidative stress, in this work, we studied the antioxidant capacity of hydroalcoholic extracts from leaves of *Hypericum perforatum* and *Thymus vulgaris* leaves. Both extracts, to varying extent prevented microsomal lipid peroxidation, and prevented and reversed the microsomal oxidation of thiols, phenomena induced by the pro-oxidant system Fe^{+3} / ascorbate. These extracts also chelated Cu^{+2} ions, activity measure by the change in the absorbance spectrum of this ion in the presence of the herbal extracts. Moreover, the extracts tested inhibited microsomal GSH-transferase, an enzyme whose active form is the dimer-SS-. The polyphenols concentration was determined for each extract to be used as a marker of the antioxidant capacity. The results showed that the antioxidants activities tested not only depend on the content of polyphenols, but also on differences in lipophilicity of the antioxidants present in both extracts, a property that would favor the microsomal membrane affinity. Moreover, it is also likely that there are differences in the redox potential of the antioxidant, in this case this property favor those antioxidants in *Thymus vulgaris* extract. At the end of the manuscript, the results are discussed from the pharmacological point of view.

I. INTRODUCCIÓN

El *Thymus vulgaris* (Tomillo), planta de la familia Lamiaceae es originaria de Asia occidental, Europa Central y el norte de África, pero también es posible encontrarla a manera de cultivo en diferentes lugares del planeta. Prefiere los terrenos secos, soleados y calcáreos. La droga vegetal corresponde a las hojas de Tomillo.

Las hojas de Tomillo están compuestas por aceites esenciales (1,0 – 2,5%), entre ellos podemos mencionar el timol y el carvacrol que serían los aceites esenciales más abundantes en esta planta (Formáček y cols., 1982; Mateo y cols., 1978; Richard y cols., 1985; Proenca y cols., 1991). Por otra parte, diversos flavonoides han sido aislados de esta planta; entre ellos se mencionan: pigenina, luteonina, numerosas flavonas metoxiladas (figura 2) como el cirsilineol, la cirsimaritina, la 5-desmetilnobiletina, la eupatorina, la gardenina D, el 8-metoxi-cirsilineol, la sideritoflavona, la timonina, la timusina y el xantomicrool.



Figura 1. *Thymus vulgaris*

El Tomillo generalmente se utiliza como condimento de alimentos. Sin embargo, diversas propiedades farmacológicas se han descrito para las hojas de *Thymus vulgaris*:

- ✓ *Actividad antiespasmódica y expectorante*, provoca una fluidificación de las secreciones bronquiales favoreciendo su eliminación. (Müller-Limmroth y cols., 1980).
- ✓ *Actividad antiséptica y antibacteriana* (Peris y cols., 1995; Didry y cols., 1994; Simeon de Bouchberg y cols., 1976), su actividad es contra gérmenes Gram positivos y Gram negativos, debido a la acción sobre la membrana bacteriana. (Juven y cols., 1994).
- ✓ *Actividad antiinflamatoria* (Cañigüeral y cols., 1998).
- ✓ *Actividad antioxidante*, (Baranauskiene y cols., 2003).
- ✓ *Actividad parasitaria* (Chao y cols., 2000; Horne y cols., 2001).
- ✓ *Enfermedades de la piel*, en casos de úlceras, piorrea o estomatitis y como sedante para aliviar la psoriasis (Beer y cols., 2007) excesiva secreción de grasa en el rostro, como ocurre en el acné (Leung y cols., 1996).

Aunque existen los estudios ya sea in vitro e in vivo de las actividades farmacológicas antes mencionadas, formulaciones farmacéuticas con extractos de Tomillo, son escasas.

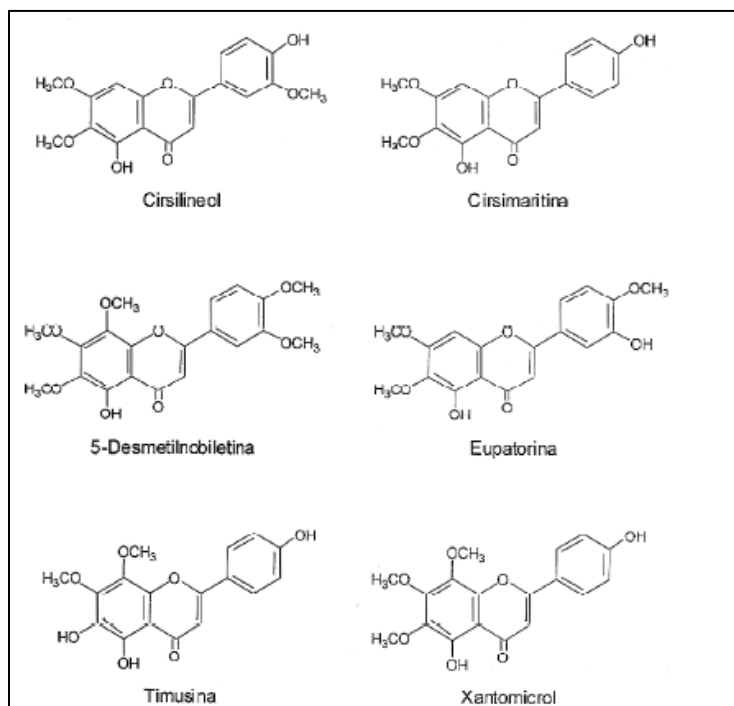


Figura 2. Principales compuestos bioactivos de *Thymus vulgaris*

El *Hypericum perforatum* (Hierba de San Juan) planta de la familia Clusiaceae es originaria de Europa, Asia y África del Norte, e introducida en Chile, donde crece desde la VI a la X Región. La droga vegetal está compuesta por las flores o las partes aéreas secas de *Hypericum perforatum* L. recolectadas antes o durante el periodo de floración (Escop, 1996).

Las inflorescencias de la Hierba de San Juan son utilizadas para la formulación de extractos con actividad antidepresiva, que es el principal uso farmacológico que se le da a esta planta (Gaster y cols., 2000).

Las hojas de la Hierba de San Juan contienen flavonoides (2-4%) entre los cuales se mencionan hiperósidos, quercetina, rutina, isoquercetina, biflavonoides (amentoflavona). Contienen además 0,1-0,15% de derivados antracénicos, naftadihidrodiantronas (hipericina y pseudohipericina), xantona, acilfloroglucinoles (hiperforina y en pequeñas cantidades adiperforina), aceites

esenciales (compuestos principalmente por hidrocarburos alifáticos), procianidinas oligoméricas, taninos catéquicos, derivados del ácido caféico (ácido clorogénico) (figura 4) (PDR, 1998).



Figura 3. *Hypericum perforatum*

Cabe señalar que diversas propiedades farmacológicas se han asignado a las hojas de La Hierba de San Juan:

- ✓ *Actividad antidepresiva* (Micromedex, 2005).
- ✓ *Actividad antiinflamatoria* (Albert y cols., 2002)
- ✓ *Actividad antibacteriana* (Micromedex, 2005).
- ✓ *Actividad antiviral* (Cohen y cols., 1996).
- ✓ *Actividad antioxidante* (Silvaa y cols., 2005).

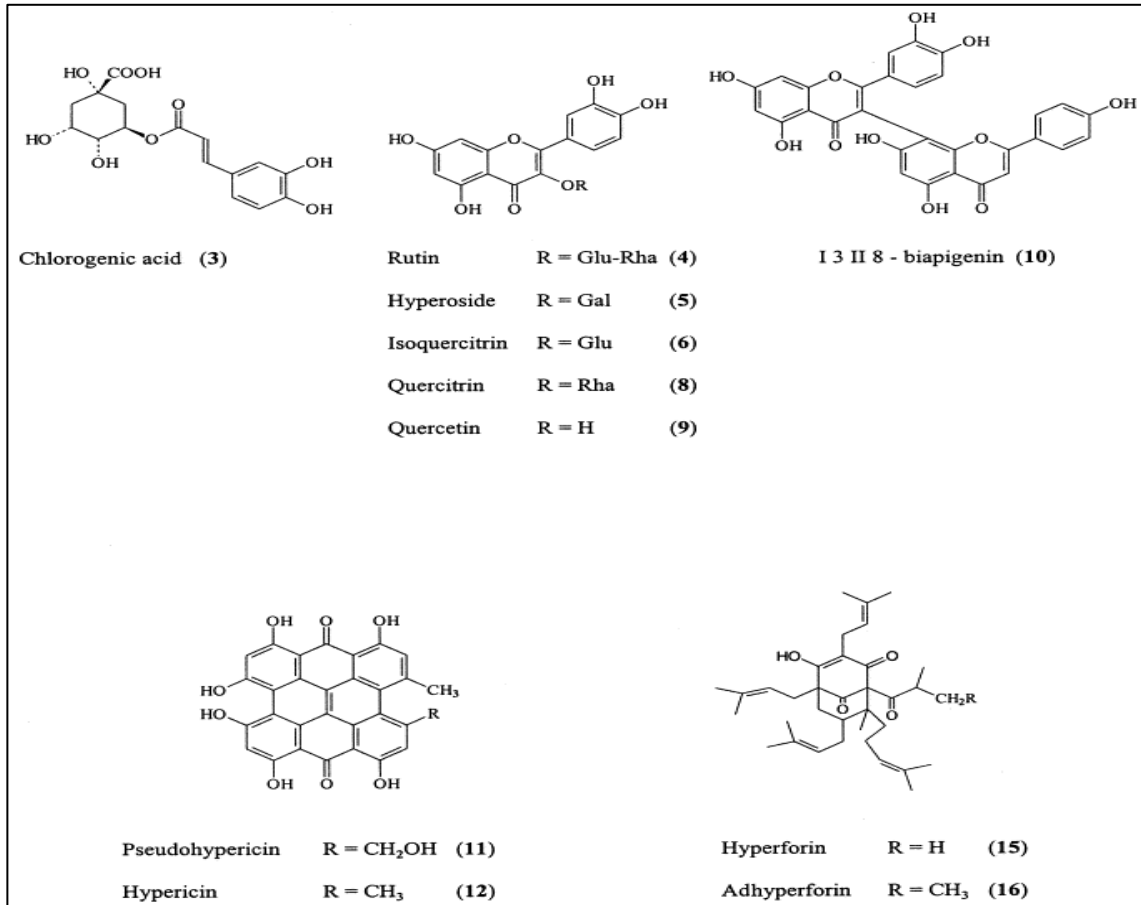


Figura 4. Principales compuestos bioactivos de *Hypericum perforatum*.

Los antecedentes presentados de ambas plantas medicinales, muestran la presencia en ellas de componentes polifenólicos de reconocida actividad antioxidante.

Capacidad antioxidante de *Thymus vulgaris* (Tomillo). Escasos son los estudios acerca de la actividad antioxidante biológica de las hojas de esta planta. Ellos muestran que esta actividad se debería a sus flavonas y a un constituyente bifenílico más activo que el BHT (terbutil-hidroxitolueno), reconocido antioxidante de alimentos. Así, a concentraciones 1µM dichos compuestos inhiben la peroxidación lipídica inducida *in vitro* a nivel de

mitocondrias y microsomas y asimismo, en forma parcial, la producción de anión superóxido (Bruneton, 2001).

Capacidad antioxidante de *Hypericum perforatum* (Hierba de San Juan).

Existen estudios acerca de la capacidad antioxidante de las hojas de esta planta como extracto alcohólico. En este estudio se determinó que la capacidad antioxidante se debía a la presencia de flavonoides (quercitina y heterósido) y a ácido clorogénico. Este extracto inhibió la lipoperoxidación mitocondrial y microsómica inducida por el sistema Fe^{+3} /ascorbato (Silvaa y cols., 2005).

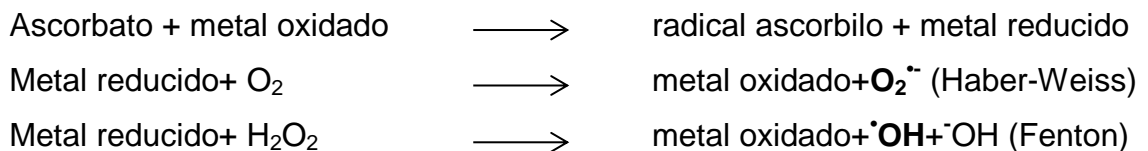
Capacidad Antioxidante celular. Las principales especies oxidantes de los seres vivos están representadas por las especies reactivas de oxígeno (EROs). Estas especies se tornan tóxicas para el organismo cuando sobrepasan la capacidad antioxidante celular. Cuando esto ocurre se genera el fenómeno conocido como *estrés oxidativo* (Benzie y cols., 2000; Deneke y cols., 2000).

Los organismos vivos poseen mecanismos antioxidantes enzimáticos y no enzimáticos que tienen como objetivo prevenir y disminuir el daño oxidativo. Los mecanismos enzimáticos están representados principalmente por la superóxido dismutasa (SOD) que dismuta a peróxido de hidrógeno el radical anión superóxido (O_2^-), la catalasa que convierte el peróxido de hidrógeno en H_2O y O_2 y la GSH-peroxidasa que convierte los peróxidos a alcoholes. Los mecanismos no enzimáticos incluyen al GSH, antioxidante tiólico el cual se encuentra en concentraciones mM en la célula, las Vitaminas E, A y C y β -caroteno (Halliwell y cols., 2004).

Las plantas poseen además de los mecanismos antioxidantes mencionados, metabolitos de tipo polifenólicos los cuales son especialmente abundantes en

las hojas; estos las protegen de la radiación solar UV (De Gara y cols., 2010; Kornas y cols., 2010).

Los principales mecanismos antioxidantes de los polifenoles y tioles incluyen su capacidad de atrapar radicales libres del oxígeno y de quelar metales de transición en su estado iónico libre. Estos metales generan especies reactivas del oxígeno a través de las reacciones de Haber-Weiss y/o Fenton (De Gara y cols., 2010; Sies y cols., 2010).



Cabe señalar que existen diferencias entre las propiedades antioxidantes de los compuestos polifenólicos y tiólicos. Así, la oxidación de las biomoléculas tiólicas puede ser revertida por agentes antioxidantes tiólicos, pero no la de los polifenoles (Bors y cols., 2002; Sies y cols., 2010). En todo tipo de células esta reversibilidad es el resultado de mecanismos enzimáticos concertados que involucran el uso del tripéptido GSH (Schafer y cols., 2001; Wu y cols., 2004). El estado redox de los sistemas tiólicos que son sensibles a oxidantes no-radicalarios, son controlados por las tiorredoxinas (Trx), GSH y cisteína (Wouters y cols., 2010; Brosnan y cols., 2008). Los sistemas regulados por las tiorredoxinas y el GSH se mantienen en condiciones estables pero no en equilibrio, debido a una continua oxidación de los tioles celulares; ellos se oxidan a una velocidad aproximada de 0,5% de los tioles totales/min (Brosnan y cols., 2008; Banerjee y cols., 2008).

El fenómeno de estrés oxidativo puede ocurrir además, sin la presencia de radicales libres del oxígeno (Jones y cols., 2008). Ello puede ocurrir por

consumo irreversible de los equivalentes reductores celulares. Así, los compuestos polifenólicos y tiólicos pueden actuar como agentes reductores y también como agentes nucleofílicos (Bors y cols., 2002; Sies y cols., 2010; Shafer y cols., 2010; Wu y cols., 2004). Es por ello, que ellos pueden formar aductos covalentes con metabolitos electrofílicos. A nivel celular, los metabolitos electrofílicos son altamente reactivos y por tanto, muy tóxicos; ellos pueden reaccionar con proteínas y ácidos nucleicos (ARN y ADN) debido a la presencia de grupos amino y sulfhidrilos en estas macromoléculas. Cabe señalar que cuando los compuestos polifenólicos y tiólicos reaccionan como nucleófilos formando aductos, ellos son consumidos irreversiblemente, lo que provoca una disminución de la capacidad antioxidante celular (Klaassen y cols., 2010). En este sentido, los compuestos tiólicos se comportan como agentes nucleofílicos. Los compuestos electrofílicos que se comportan como oxidantes no-radicalarios, incluyen peróxidos, aldehídos, quinonas y epóxidos; ellos son generados enzimáticamente de precursores endógenos y no requieren intermediarios radicalarios para oxidar compuestos tiólicos celulares (Wouters y cols., 2010). Los compuestos electrofílicos pueden ser generados además, como productos de la biotransformación de xenobióticos, entre ellos los fármacos y los contaminantes ambientales (Newcomb y cols., 2005).

Si estos oxidantes se generan en forma aberrante, ellos podrían afectar los circuitos tiólicos, alterando las funciones biológicas de ellos. Más aún, los tioles de bajo peso molecular, GSH y cisteína, pueden actuar como agentes quelantes de iones metálicos, lo cual también podría ocurrir con los grupos tiólicos redox sensibles de proteínas, alterando su función (Brosnan y cols., 2008; Bernarjee y cols., 2008).

Resumiendo, en la célula animal el estrés oxidativo puede ocurrir como consecuencia de un cambio redox de los circuitos tiólicos y del consumo

irreversible de GSH y cisteína, debido a la formación de aductos covalentes (Jones y cols., 2008). El estrés oxidativo inducido a través de los circuitos tiólicos parece ser más importante que el generado por las EROs (Wouters y cols., 2010). Existen tioles redox-sensibles presentes en diferentes proteínas y/o péptidos que son críticos en transducción de señales (ej. H-Ras, PTP-1B), factores de transcripción que se unen a DNA (ej. Nrf2, NFκβ), activación de receptores (ej. integrina αIIβ3 en la activación de plaquetas), etc. (Wouters y cols., 2010). Más aún, el envejecimiento, como también, las enfermedades relacionadas con éste, se asocian a la interrupción de la función y la homeostasis de los circuitos tiólicos, característica central del estrés oxidativo observado (Wouters y cols., 2010).

En general, todas las patologías, en mayor o menor grado, están asociadas a estrés oxidativo (Fulda y cols., 2010). Por lo tanto, extractos polivalentes podrían asociarse a las estrategias terapéuticas realizadas con fármacos sintéticos para aumentar la capacidad antioxidante celular de los pacientes.

Como se mencionó anteriormente, a pesar de sus usos terapéuticos, existen escasos estudios acerca de la actividad antioxidante biológica de *Thymus vulgaris* e *Hypericum perforatum*. Es por ello que en este trabajo se caracterizaron extractos hidroalcohólicos de hojas de Tomillo y de Hierba de San Juan, respecto de su capacidad de proteger moléculas biológicas de la oxidación inducida por EROs. Para ello, utilizamos como fuente de moléculas biológicas, microsomas hepáticos de rata, preparación experimental enriquecida en retículo endoplásmico. Como sistema pro-oxidante, utilizamos Fe⁺³/ascorbato, sistema que genera radicales libres del oxígeno a través de las reacciones de Haber-Weiss y/o Fenton. Dado que los iones metálicos libres en su estado reducido pueden generar EROs, se evaluó además, la capacidad del extracto de quelar Cu⁺². La toxicidad de estos iones metálicos está ligada

especialmente a la capacidad de ellos de unirse a proteínas y bases nitrogenadas, modificando así, las estructuras de estas biomoléculas. Enfermedades que se relacionan especialmente con este fenómeno son las patologías neurodegenerativas, las cuales se ha demostrado que la eficacia de su tratamiento aumenta al asociar terapias antioxidantes. Más aún, las concentraciones intracelulares de iones Cu^{+2} y Fe^{+3} se encuentran aumentadas en estas patologías (Wouters y cols., 2010).

La actividad antioxidante de preparados herbales puede contribuir a aumentar la eficacia de fitofármacos o de fármacos sintéticos. Además, preparados herbales que poseen actividad antioxidante pueden también ser utilizados como nutracéuticos. Es por ello que en este trabajo se propuso caracterizar respecto de su actividad antioxidante biológica a los extractos hidroalcohólicos de Tomillo y Hierba de San Juan. Ambos extractos inhibieron la oxidación de lípidos y proteínas microsómicas, como también fueron capaces de quelar Cu^{+2} . La actividad antioxidante del extracto de Tomillo sin embargo, fue mayor que aquella de la Hierba de San Juan.

HIPÓTESIS

*“Los extractos hidroalcohólicos provenientes de hojas de *Thymus vulgaris* y de *Hypericum perforatum*, tienen propiedades antioxidantes.”*

Este postulado se abordará determinando la capacidad antilipoperoxidante microsómica, la prevención y reversión de la oxidación de los tioles proteicos microsómicos, como también la capacidad quelante de los extractos mencionados.

OBJETIVO GENERAL

Caracterizar extractos de Tomillo y de Hierba de San Juan, en cuanto a su actividad antioxidante biológica.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Determinar la concentración total de polifenoles de los extractos de Tomillo y Hierba de San Juan.
2. Determinar la capacidad de los extractos de prevenir la lipoperoxidación microsómica inducida por el sistema Fe^{+3} /ascorbato.
3. Determinar la capacidad de los extractos de prevenir y revertir la oxidación de los tioles microsómicos inducida por el sistema Fe^{+3} /ascorbato.
4. Evaluar la capacidad de los extractos de inhibir la actividad de la GSH-transferasa microsómica, enzima cuya forma activa corresponde al dímero – S-S-.
5. Determinar la capacidad quelante de metales de los extractos espectrofotométricamente, determinando la disminución de los tioles microsómicos inducida por la presencia de $CuSO_4$ en ausencia y presencia del extracto.

II. MATERIALES Y MÉTODOS

Reactivos. BSA, FeCl₃, CuSO₄, Catequina [(+)-cianidol-3, (2R,3S)-2-(3,4-dihidroxifenil)-3,4-dihidro-1(2H)-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 y GSH se obtendrán de Sigma-Aldrich. El resto de los reactivos utilizados fueron del mejor grado analítico. Los extractos fueron donados por Laboratorios Ximena Polanco (Santiago, Chile).

1. Extracto hidroalcohólico de Tomillo (*Thymus vulgaris*)
Serie N° 020143
2. Extracto hidroalcohólico de Hierba de San Juan (*Hypericum perforatum*)
Serie N° 020413

Animales de experimentación. Se utilizaron ratas macho adultas de la cepa Sprague Dawley, de tres meses de edad y de un peso corporal aproximado de 250g. Estos animales se obtuvieron del Bioterio de la Facultad de Medicina de la Universidad de Chile. Los animales se mantuvieron con una dieta normal de *pellet*, agua *ad libitum*, ciclos de luz y oscuridad, y a una temperatura ambiental de 21°C. Todos los procedimientos se desarrollarán 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). Las ratas fueron sometidas a ayuno por 15 horas con agua *ad libitum*, y sacrificadas por decapitación. Los hígados fueron perfundidos *in situ* con 0,9 % P/V NaCl, removidos por incisión, y puestos en hielo. Todos los procedimientos de homogenización y fraccionamiento fueron realizados a 4 °C, y todas las centrifugaciones fueron realizadas usando, ya sea, una centrifuga con refrigeración Hermle modelo

Z326K o una ultracentrífuga Beckman modelo XL-90. El tejido hepático (9-11 g de peso húmedo), carente del tejido conectivo y vascular, fue homogenizado con 4 volúmenes de 0,154 M de KCl, con ocho pasajes en un homogeneizador Dounce Wheaton B utilizando un motor Heidolph modelo RZR1 a 250rpm. El homogeneizado fue centrifugado a 9.000 g por 15 min y el sedimento fue descartado. El sobrenadante obtenido fue centrifugado a 105.000 g por 60 min. El *pellet* (microsomos) fue almacenado a -80 °C en un freezer IL-Shin modelo DF8514 por hasta 3 meses. La cuantificación de la proteína microsómica se determinó por el método de Lowry y cols., (1951), utilizando albúmina sérica de bovino (fracción IV) como estándar.

Cuantificación de Polifenoles: La determinación de polifenoles totales se realizó de acuerdo al método de Letelier y cols. (2009). Este método utiliza catequina (figura 5) como estándar.

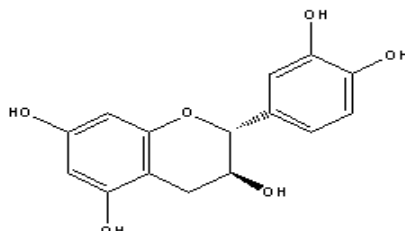


Figura 5. Catequina

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

Condiciones oxidativas: Se utilizó FeCl_3 600 μM y ascorbato 1 mM (concentraciones finales en la mezcla de reacción) como sistema generador de anión superóxido ($\text{O}_2^{\cdot-}$).

Lipoperoxidación microsómica: La lipoperoxidación microsómica inducida por el sistema oxidante Fe^{3+} /ascorbato se estimó determinando las sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico (TBARS) de acuerdo al método descrito por Letelier y cols., (2008). El malondialdehído generado como producto de la descomposición de los lipoperóxidos formados, reaccionó con el ácido tiobarbitúrico dando lugar a un conjugado (Figura 6), el cual posee una absorbancia máxima a 532 ηm (Coeficiente de extinción molar a 532 ηm = 156.000 $\text{M}^{-1}\text{cm}^{-1}$).

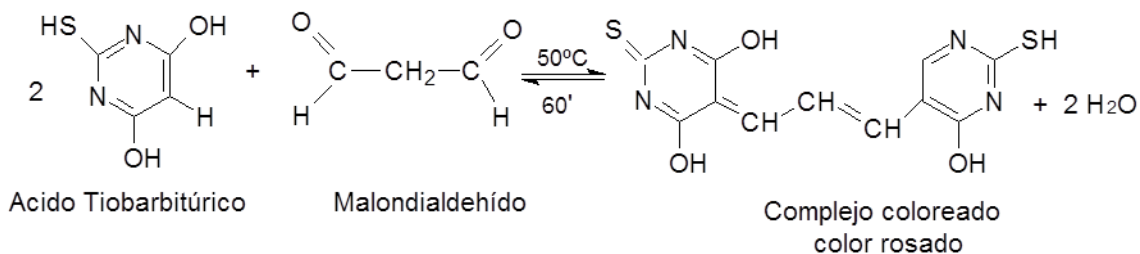


Figura 6. Formación del conjugado coloreado en la técnica de lipoperoxidación microsómica

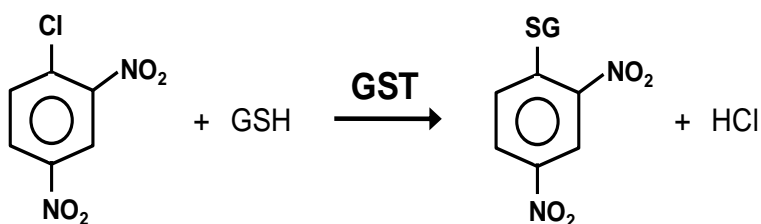
La mezcla de reacción contenía en concentraciones finales y en 1 mL de volumen final: 0,5 mg de proteína microsómica suspendidos en amortiguador fosfato 50 mM, pH 7,4; cloruro de hierro 600 μM y ascorbato de sodio 1 mM. Los blancos contenían todos los reactivos con la única excepción de la proteína microsómica. Muestras y blancos fueron incubados durante 30 min a 37 °C. Al cabo de este período, se les adicionó a muestras y blancos, 0,5 mL de TCA 20 % p/V frío (4°C). Luego los tubos que contenían proteína microsómica fueron

centrifugados a 9000 g durante 10 min a 4 °C en una centrífuga Hermle, modelo Z326K. Alícuotas de 0,5 mL de los sobrenadantes de las muestras y los blancos se mezclaron con 0,5 mL de TBA 35 mM, y luego se incubaron durante 60 min a 50 °C para el desarrollo de color. Al término de este periodo, se registró la absorbancia de las muestras a 532 nm en un espectrofotómetro UV3 Unicam UV-VIS, usando los blancos como referencia.

Determinación de la oxidación de tioles microsomales. La medición de los tioles microsómicos se realizó de acuerdo a la técnica descrita por Letelier y cols., (2008). Esta técnica cuantificó espectrofotométricamente el TNB liberado en la reacción entre el DTNB y los grupos sulfhidrilos presentes en la muestra. Este compuesto absorbe a 412 nm y su coeficiente de extinción es $13.600 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$. La mezcla de reacción contenía en un volumen de 1,0 mL, los reactivos siguientes (concentraciones finales): amortiguador fosfato de potasio 50 mM, pH 7,4; proteína microsómica 0,5 mg; concentraciones de los distintos extractos naturales; FeCl_3 600 μM ; ascorbato 1 mM; DTNB 0,3 mM. Los blancos contenían todos los reactivos, a excepción de la proteína microsómica. Las mezclas se incubaron durante 20 min, a 37 °C, en un baño termostático y con agitación constante. A continuación se adicionó el DTNB a todas las mezclas y se incubaron nuevamente durante 60 min a 37 °C en un baño termostático con agitación constante. Al cabo de este período las muestras se centrifugaron a 9.000 g durante 10 min en una centrífuga refrigerada (4 °C) Heraeus Biofuge 15R, con el objeto de decantar la suspensión microsómica. A continuación, se leyeron las absorbancias de los sobrenadantes a 412 nm en un espectrofotómetro Unicam UV VIS modelo UV3 acoplado a un computador, utilizando para ello sus blancos respectivos como referencia. El contenido de tioles fue expresado en % de tioles microsomales recuperados/ 0,5 mg de proteína microsómica. Se probó prevención (sistema pro-oxidante se agrega

posterior al extracto herbal) y reversión de tioles oxidados (sistema pro-oxidante se agrega antes que el extracto herbal).

Actividad GSH-transferásica microsómica. La conjugación de 1-cloro-2,4-dinitrobenceno con GSH, reacción catalizada por la GSH-transferasa (GST) se ensayó de acuerdo al método descrito en Letelier y cols., 2010. La ecuación química es la siguiente:



La mezcla de reacción contenía (concentraciones finales) en un volumen de 1 mL: amortiguador fosfato 0,1 M pH 6,5; 1-cloro-2,4-dinitrobenceno 1 mM; GSH 4 mM; proteína microsómica 100 $\mu\text{g/mL}$. El blanco contenía todos los reactivos, a excepción de GSH. La reacción se inició agregando 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. La aparición del conjugado se midió en forma continua, a 340 nm 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.

Quelación de Cu^{2+} . Una solución de CuSO_4 0,5 mM en ausencia y presencia de los extractos herbales en estudio fue sometida a un barrido entre 200 y 600 nm, en un espectrofotómetro UV-VIS modelo UV3 acoplado a un computador. El espectro del CuSO_4 0,5 mM se realizó utilizando como referencia, amortiguador fosfato 50 mM, pH 7,4. La referencia en el caso de las mezclas CuSO_4 /extracto fue una alícuota del extracto en ensayo diluida en amortiguador fosfato 50 mM, pH 7,4.

Análisis estadístico. Los datos presentados corresponden al promedio de al menos 3 y/o 4 experimentos independientes \pm SD. La significancia estadística (t-Student) y los análisis de correlación se realizaron usando el software GraphPad Prism 5.0. Las diferencias se consideraron como significativas, cuando $p < 0,05$.

III. RESULTADOS

Polifenoles totales de los extractos herbales. La Tabla 1 muestra el contenido de polifenoles de los extractos expresado en mg equivalentes de catequina/mL de extracto y en η moles equivalentes de catequina/ μ L. El compuesto de catequina fue utilizado como estándar. El contenido de polifenoles del extracto de la Hierba de San Juan fue aproximadamente 3 veces superior a aquel del Tomillo.

Tabla 1. Polifenoles totales

Extracto	mg equivalentes de catequina/mL	η moles equivalentes de catequina/ μ L
Tomillo	6,31 \pm 0,41	21,7 \pm 1,41
Hierba de San Juan	19,81 \pm 0,95	68,2 \pm 3,27

La cuantificación de polifenoles se realizó de acuerdo a la técnica descrita en Métodos. Los valores representan el promedio de al menos 3 experimentos independientes \pm DE.

Prevención de la lipoperoxidación microsómica inducida por el sistema Fe^{+3} /ascorbato en presencia de los extractos herbales. La Figura 7 muestra las curvas de las concentraciones de los extractos expresadas en η moles de polifenoles equivalentes de catequina/0,5 mg de proteína microsómica *versus* el % de lipoperoxidación microsómica residual. Ambos extractos mostraron un efecto inhibitorio concentración – respuesta sobre la lipoperoxidación microsómica inducida por el sistema pro-oxidante Fe^{+3} /ascorbato. A partir de estos datos, se construyeron las curvas semilogarítmicas que se muestran en las Figura 8. De estas curvas se obtuvieron los EC_{50} que aparecen en la Tabla 2. El valor de EC_{50} representa la cantidad de extracto expresada en η moles de

polifenoles, que es capaz de prevenir en un 50% la lipoperoxidación microsómica inducida por el sistema Fe^{+3} /ascorbato.

El extracto de Tomillo mostró el menor EC_{50} (3,0 μmoles equivalentes de catequina/0,5 mg proteína microsómica) en comparación con el extracto de Hierba de San Juan (8,18 μmoles equivalentes de catequina/0,5 mg proteína microsómica). Por lo tanto, la actividad antilipoperoxidante del extracto de Tomillo fue aproximadamente 2,7 veces mayor que la del extracto de Hierba de San Juan.

Uno de los mecanismos a través de los cuales los antioxidantes polifenólicos ejercen su efecto antioxidante es a través de su capacidad de secuestrar radicales libres. El pro-oxidante utilizado en estos ensayos fue el sistema Fe^{+3} /ascorbato el cual genera el radical anión superóxido a través de la reacción de Haber-Weiss/Fenton. Por lo tanto, podría existir una posible proporcionalidad entre la capacidad anti-lipoperoxidante (EC_{50}) y la concentración de polifenoles de los extractos. La Figura 9, muestra una comparación entre el contenido de polifenoles y los EC_{50} de la lipoperoxidación. En ella se observa que no existe una proporcionalidad entre estas variables. Los valores de la Figura 9 aparecen en la tabla 2; la razón [Polifenoles] / EC_{50} de ambos extractos ensayados no coincide, lo cual confirma la falla en la proporcionalidad de dichas variables.

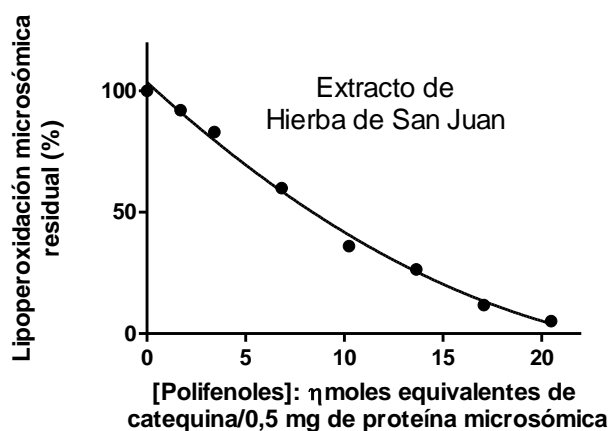
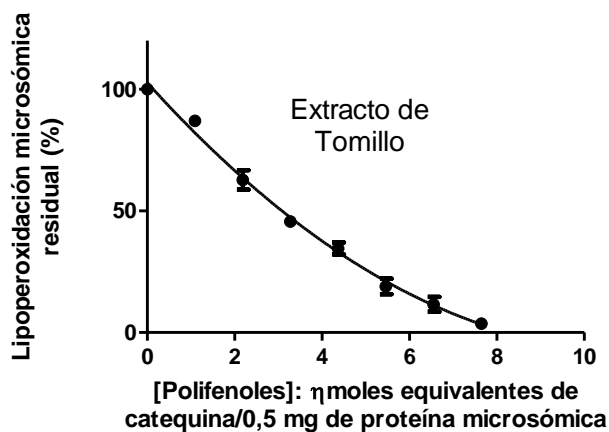


Figura 7. Lipoperoxidación microsomica inducida por el sistema Fe^{+3} /ascorbato en presencia de los extractos herbales. El porcentaje de lipoperoxidación residual fue calculado considerando como 100% aquel obtenido en ausencia de extracto. El ensayo de lipoperoxidación se realizó de acuerdo a lo descrito en Métodos. Los valores representan el promedio de al menos 3 experimentos independientes \pm DE. Tomillo, $r^2=0,9926$. Hierba de San Juan, $r^2=0,9928$.

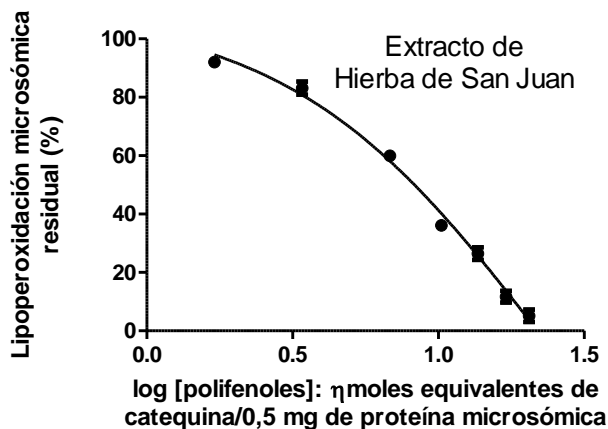
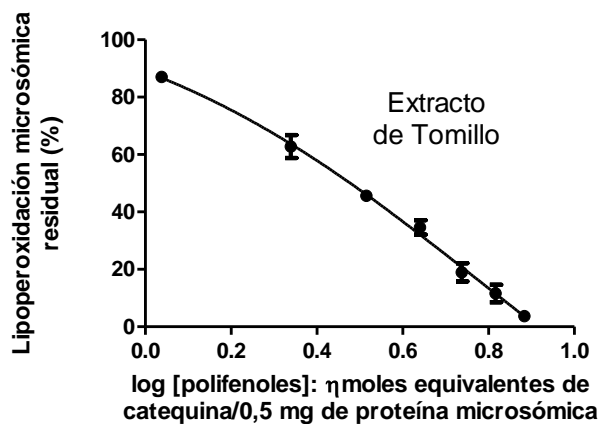


Figura 8. Gráficos semilogarítmicos de la lipoperoxidación microsómica inducida por el sistema Fe^{+3} /ascorbato en presencia de extractos herbales. Estos gráficos fueron construidos a partir de los valores de las figura 5. Los valores representan el promedio de al menos 3 experimentos independientes \pm DE. Tomillo, $r^2= 0,9922$. Hierba de San Juan, $r^2= 0,9930$.

Tabla 2. EC₅₀ de los extractos de Tomillo y Hierba de San Juan obtenidos en la lipoperoxidación microsómica inducida por el sistema Fe⁺³/ascorbato.

Extracto	EC ₅₀ (η moles)	[Polifenoles]	[Polifenoles] / EC ₅₀
Extracto de Tomillo	3,00	21,70	7,23
Extracto de Hierba de San Juan	8,18	68.20	8,33

EC₅₀: concentración de extracto expresada en ηmoles equivalentes de catequina /0,5 mg de proteína microsómica, que previene en un 50% la lipoperoxidación microsómica inducida por Fe⁺³/ascorbato. Los valores fueron obtenidos de los gráficos semilogarítmicos que aparecen en la Figura 6. [Polifenoles]: η moles equivalentes de catequina/μL de extracto (Tabla 1).

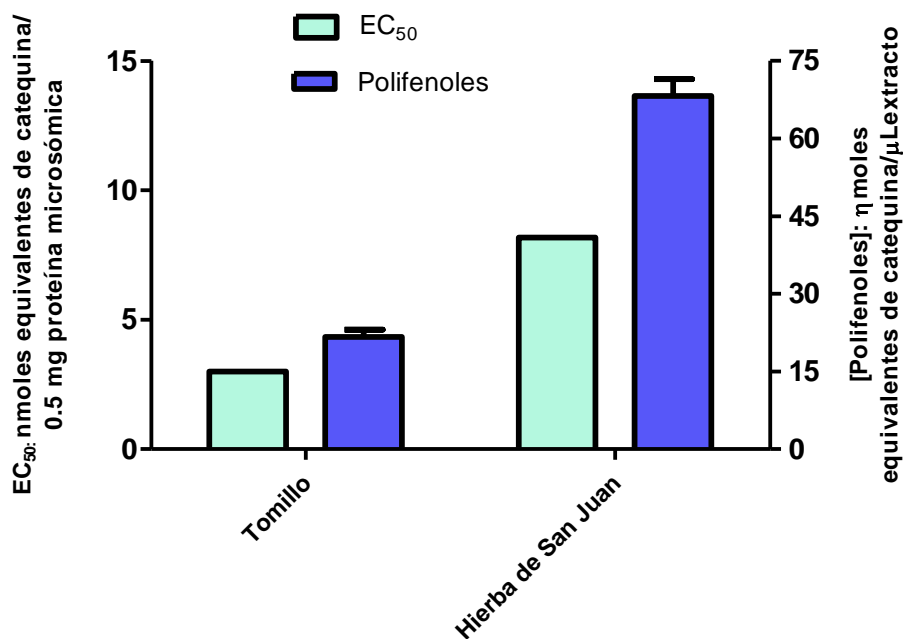


Figura 9. EC₅₀ de la lipoperoxidación microsómica versus la concentración de polifenoles de los extractos. Los valores de EC₅₀ fueron obtenidos de las curvas semilogarítmicas y aparecen en la Tabla 2.

Prevención de la oxidación de tioles microsómicos inducida por el sistema Fe^{+3} /ascorbato. La Figura 10 muestra las curvas de las concentraciones de los extractos expresadas en η moles de polifenoles equivalentes de catequina/ 0,5 mg de proteína microsómica *versus* el % de oxidación de tioles microsómicos recuperados. Ambos extractos mostraron un efecto preventivo concentración – respuesta sobre la oxidación microsómica inducida por el sistema pro-oxidante Fe^{+3} /ascorbato. A partir de estos datos, se construyeron las curvas semilogarítmicas que se muestran en la Figura 11. De estas curvas se obtuvieron los EC_{50} que aparecen en la Tabla 3. El valor de EC_{50} representa la concentración de extracto expresada en η moles de polifenoles, que es capaz de prevenir en un 50% la oxidación de tioles microsómicos inducida por el sistema Fe^{+3} /ascorbato.

El extracto de Tomillo mostró el menor EC_{50} (8,73 η moles equivalentes de catequina/0,5 mg proteína microsómica) en comparación con el extracto de Hierba de San Juan (30,9 η moles equivalentes de catequina/0,5 mg proteína microsómica). Por lo tanto, la actividad preventiva del extracto de Tomillo fue aproximadamente 3,5 veces mayor que la del extracto de Hierba de San Juan.

La Figura 12, muestra una comparación entre el contenido de polifenoles y los EC_{50} de la prevención de la oxidación de tioles microsómicos. Los valores de este gráfico aparecen en la Tabla 3, en ella se observa que no existe una proporcionalidad entre los datos, por lo que no existe una relación entre el contenido de polifenoles y la prevención de la oxidación de los tioles microsómicos.

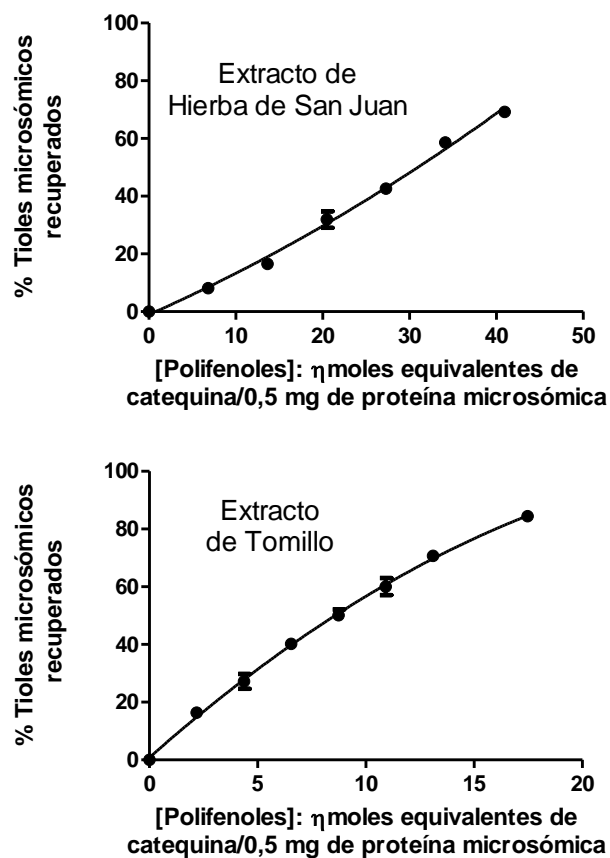


Figura 10. Prevención de la oxidación de tioles microsómicos inducida por el sistema Fe^{+3} /ascorbato en presencia de extractos herbales. El porcentaje de tioles microsómicos recuperados fue calculado considerando como 0% aquel obtenido por la diferencia entre el total de tioles microsómicos y los tioles no dañados en presencia del sistema Fe^{+3} /ascorbato y en ausencia de extracto. Los valores representan el promedio de al menos 3 experimentos independientes \pm DE. Tomillo, $r^2= 0,9935$. Hierba de San Juan, $r^2= 0,9963$.

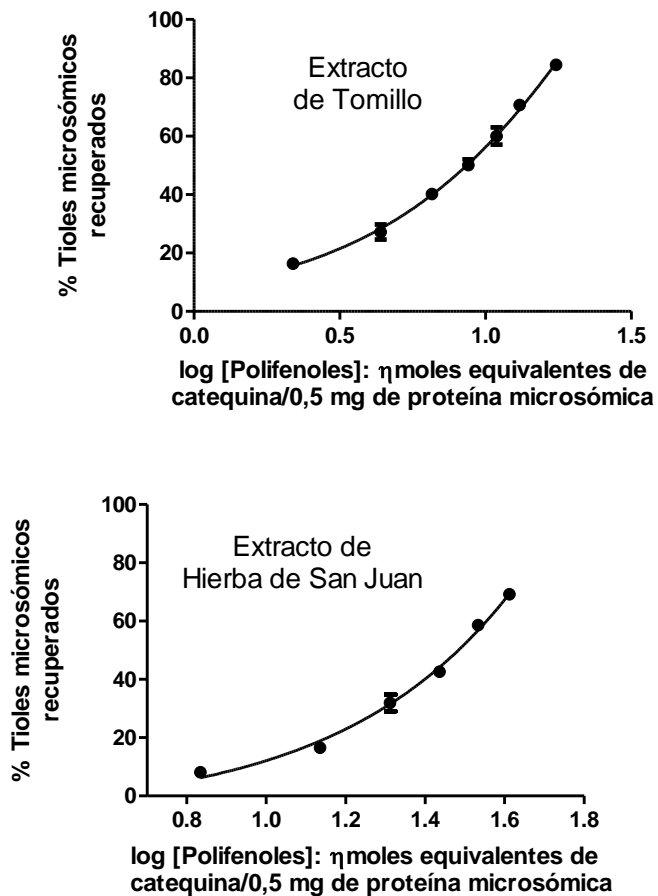


Figura 11. Gráficos semilogarítmicos de la prevención de la oxidación de tioles microsómicos inducido por el sistema Fe^{+3} /ascorbato en presencia de extractos herbales. Los gráficos semilogarítmicos fueron construidos a partir de los datos de la Figura 8. Los valores representan el promedio de al menos 3 experimentos independientes \pm DE. Tomillo, $r^2= 0,9942$. Hierba de San Juan, $r^2= 0,9915$.

Tabla 3. Comparación de los EC₅₀ de los extractos de Tomillo y Hierba de San Juan obtenidos en la prevención de la oxidación de tioles microsómicos inducida por el sistema Fe³⁺/ascorbato.

Extracto	EC ₅₀ (η moles)	[Polifenoles]	[Polifenoles]/EC ₅₀
Extracto de Tomillo	8,73	21,70	2,48
Extracto de Hierba de San Juan	30,9	68,20	2,21

EC₅₀: concentración de extracto expresada en ηmoles equivalentes de catequina /0,5 mg de proteína microsómica que previene en un 50% la oxidación de tioles microsómicos inducida por Fe³⁺/ascorbato. Los valores fueron obtenidos de los gráficos semilogarítmicos que aparecen en la Figura 9. [Polifenoles]: η moles equivalentes de catequina/μL de extracto (Tabla 1).

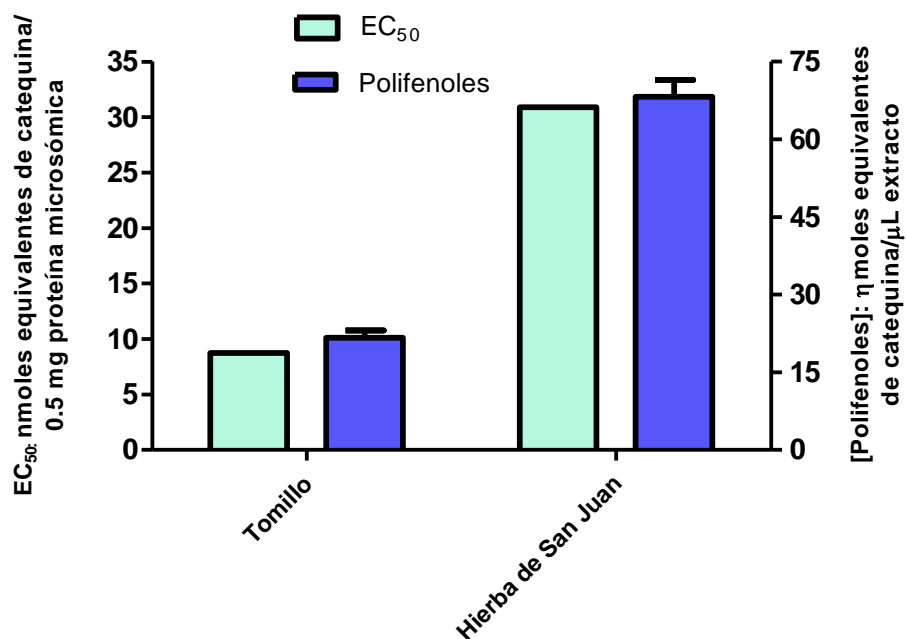


Figura 12. EC₅₀ de la prevención de la oxidación de tioles *versus* la concentración de polifenoles de los extractos. Los valores de EC₅₀ fueron obtenidos de las curvas semilogarítmicas y son los que aparecen en la Tabla 3. Los valores de concentración de polifenoles representan el promedio de al menos 4 determinaciones ± DE.

Reversión de la oxidación de tioles microsómicos inducida por el sistema Fe^{+3} /ascorbato. En la Figura 13 aparecen las curvas de las concentraciones de los extractos expresadas en η moles de polifenoles equivalentes de catequina/0,5 mg de proteína microsómica *versus* el % de oxidación de tioles recuperados. Ambos extractos fueron capaces de revertir la oxidación de los tioles microsómicos inducida por el sistema pro-oxidante Fe^{+3} /ascorbato, de una forma concentración–respuesta. A partir de estos datos, se construyeron las curvas semilogarítmicas que se muestran en las Figuras 14. De estas curvas se obtuvieron los EC_{50} que aparecen en la Tabla 4. El valor de EC_{50} representa la cantidad de extracto expresada en η moles de polifenoles capaz de revertir en un 50% la oxidación de tioles microsómicos inducida por el sistema Fe^{+3} /ascorbato.

El extracto de Tomillo mostró el menor EC_{50} (23,4 η moles equivalentes de catequina/0,5 mg proteína microsómica) en comparación con el extracto de Hierba de San Juan (67,5 η moles equivalentes de catequina/0,5 mg proteína microsómica). Por lo tanto, la capacidad de revertir la oxidación de tioles del Tomillo es aproximadamente 2,8 veces mayor que la del extracto de Hierba de San Juan.

La Figura 15, muestra una comparación entre el contenido de polifenoles y los EC_{50} de la reversión de la oxidación de tioles microsómicos. Los valores de este gráfico se presentan en la tabla 4, en ella se observa que no existe proporcionalidad entre el contenido de polifenoles y la capacidad de revertir la oxidación de los tioles microsómicos de los extractos.

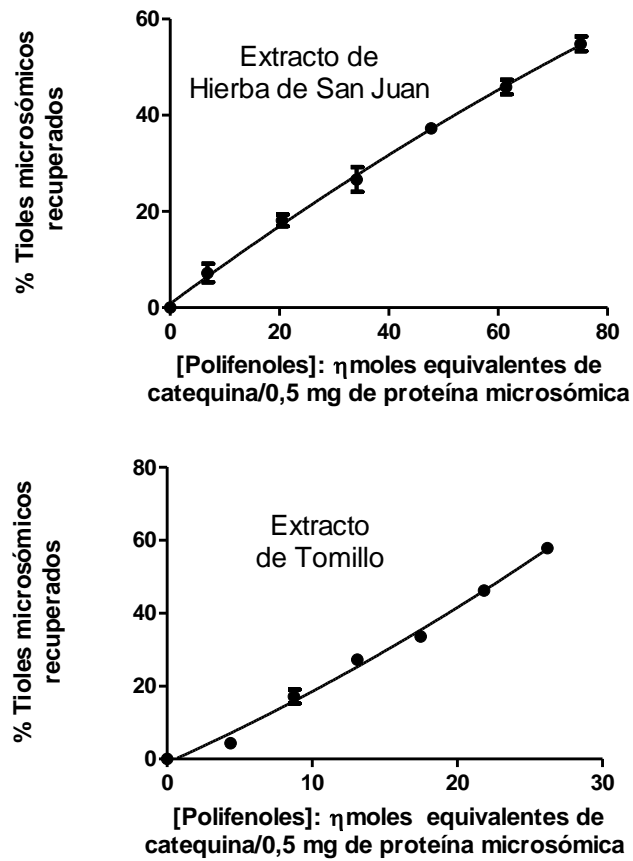


Figura 13. Reversión de la oxidación de tioles microsómicos inducido por el sistema Fe^{+3} /ascorbato en presencia de extractos herbales. El porcentaje de tioles microsómicos recuperados fue calculado considerando como 0% aquel obtenido por la diferencia entre el total de tioles microsómicos y los tioles no dañados en presencia del sistema pro-oxidante en ausencia de extracto. Los valores representan el promedio de al menos 3 experimentos independientes \pm DE. Tomillo, $r^2= 0,9942$. Hierba de San Juan, $r^2= 0,9919$.

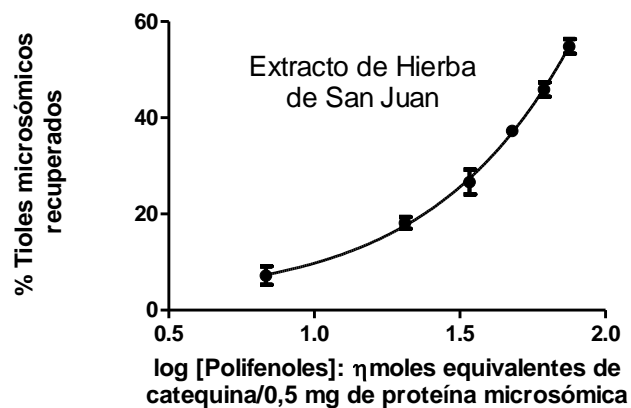
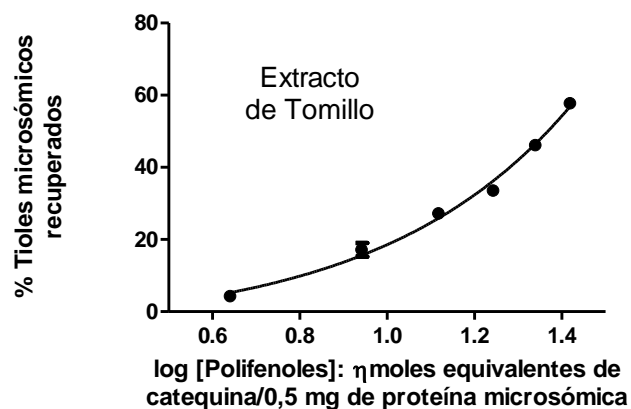


Figura 14. Gráficos semilogarítmicos de la reversión de la oxidación de tioles microsómicos inducido por el sistema Fe^{+3} /ascorbato en presencia de extractos herbales. El porcentaje de tioles microsómicos recuperados fue calculado considerando como 0% aquel obtenido por la diferencia entre el total de tioles microsómicos y los tioles no dañados en presencia del sistema Fe^{+3} /ascorbato en ausencia de extracto. Los valores representan el promedio de al menos 3 experimentos independientes \pm DE. Tomillo, $r^2 = 0,9906$. Hierba de San Juan, $r^2 = 0,9923$.

Tabla 4. Comparación de los EC₅₀ de los extractos de Tomillo y Hierba de San Juan obtenidos en la reversión de la oxidación de los tioles microsómicos inducida por el sistema Fe⁺³/ascorbato.

Extracto	EC ₅₀ (η moles)	[Polifenoles]	[Polifenoles]/EC ₅₀
Extracto de Tomillo	23,4	21,70	0,93
Extracto de Hierba San Juan	67,6	68,20	1,00

EC₅₀: concentración de extracto expresada en η moles equivalentes de catequina/0,5 mg de proteína microsómica que previene en un 50% la oxidación microsómica inducida por Fe⁺³/ascorbato. Los valores fueron obtenidos de los gráficos semilogarítmicos que aparecen en la Figura 12. . [Polifenoles]: η moles equivalentes de catequina/μL de extracto (Tabla 1).

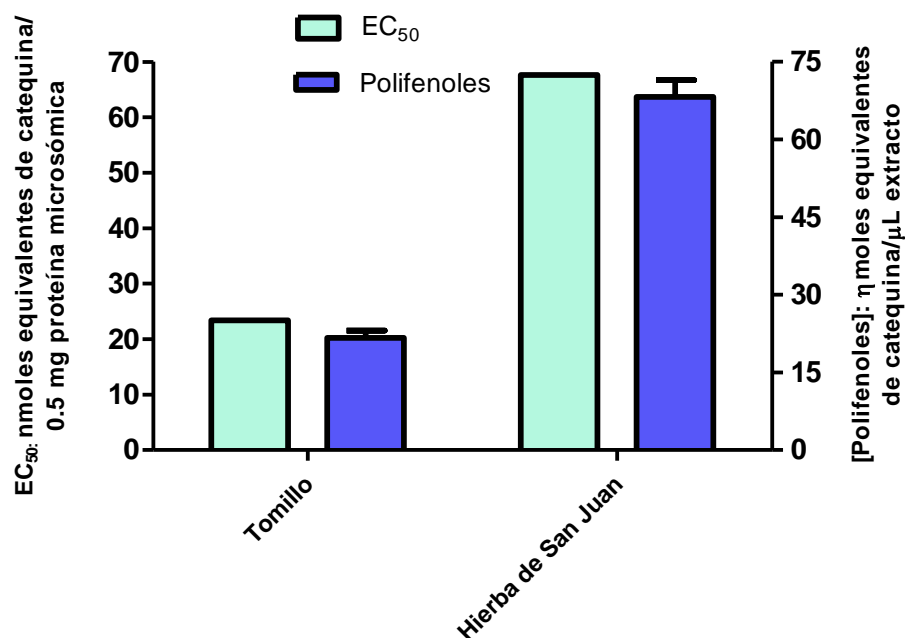


Figura 15. EC₅₀ de la reversión de la oxidación de tioles versus la concentración de polifenoles de los extractos. Los valores de EC₅₀ fueron obtenidos de los gráficos semilogarítmicos (Figura 12) y aparecen en la Tabla 4. Los valores de concentración de polifenoles representan el promedio de al menos 4 determinaciones ± DE.

Actividad GSH-transferásica microsómica en presencia de los extractos herbales. Las Figura 16 y 17 muestran las rectas obtenidas al medir la velocidad de formación del complejo GSH-DNB catalizada por la GSH-transferasa en ausencia y presencia de los extractos herbales. Las pendientes de estas rectas se muestran en la Tabla 5; ellas representan la absorbancia del conjugado formado/min, valores que corresponde a la velocidad de formación del conjugado. Estos valores de velocidad fueron transformados en η moles de conjugado formado/min/mg de proteína microsómica utilizando para ello el coeficiente de extinción del conjugado a $\epsilon_{340} \eta \text{ m} = 9,6 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$; estos valores aparecen también en la Tabla 5. Ambos extractos disminuyeron la velocidad de formación del conjugado GSH-DNB de una forma concentración-respuesta. El extracto de Hierba de San Juan provocó la mayor disminución, lo cual se ejemplifica en la Figura 18 donde aparecen las rectas experimentales obtenidas al ensayar 0,1 μL de ambos extractos en ensayo.

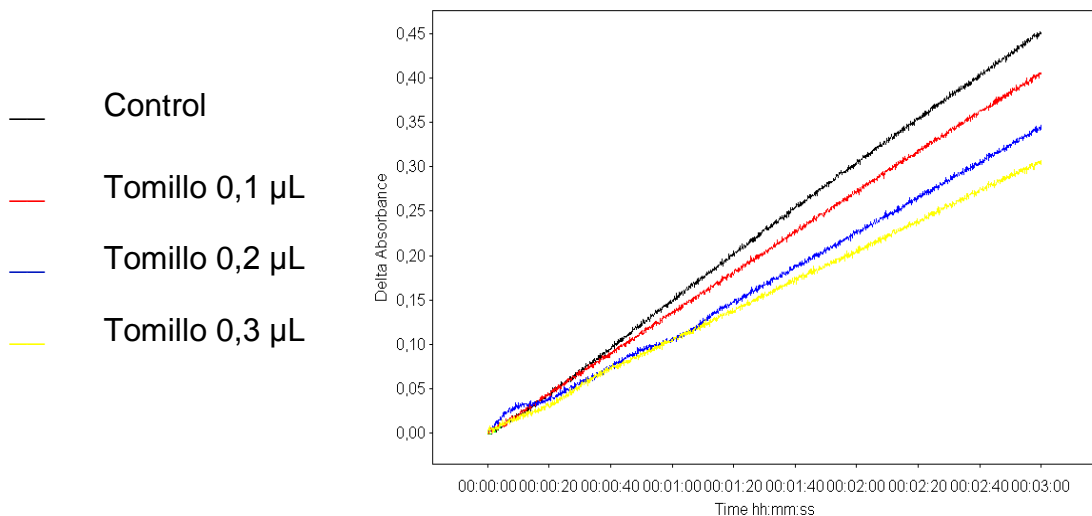


Figura 16. Gráfico experimental de la actividad GSH-transferásica microsómica en presencia del extracto de Tomillo. Datos obtenidos de la medición continua de la absorbancia a 340 ηm del conjugado GSH-DNB formado durante 3 minutos Control: actividad medida en ausencia de extracto. Las condiciones experimentales están descritas en Métodos.

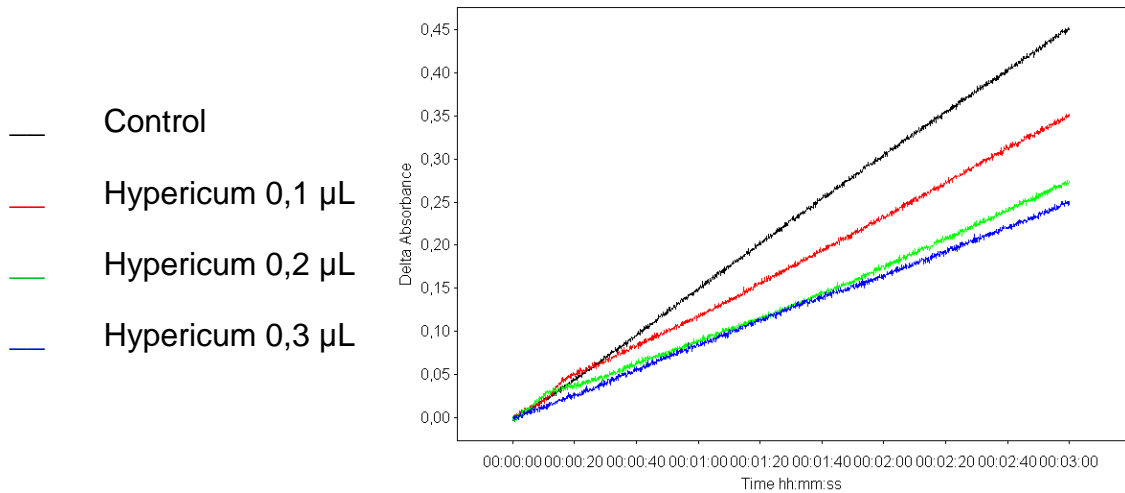


Figura 17. Gráfico experimental de la actividad GSH-transferásica microsómica en presencia del extracto de Hierba de San Juan. Datos experimentales obtenidos de la medición continua durante 3 minutos del conjugado GSH-DNB a 340 nm. Control: actividad medida en ausencia de extracto. Las condiciones experimentales están descritas en Métodos.

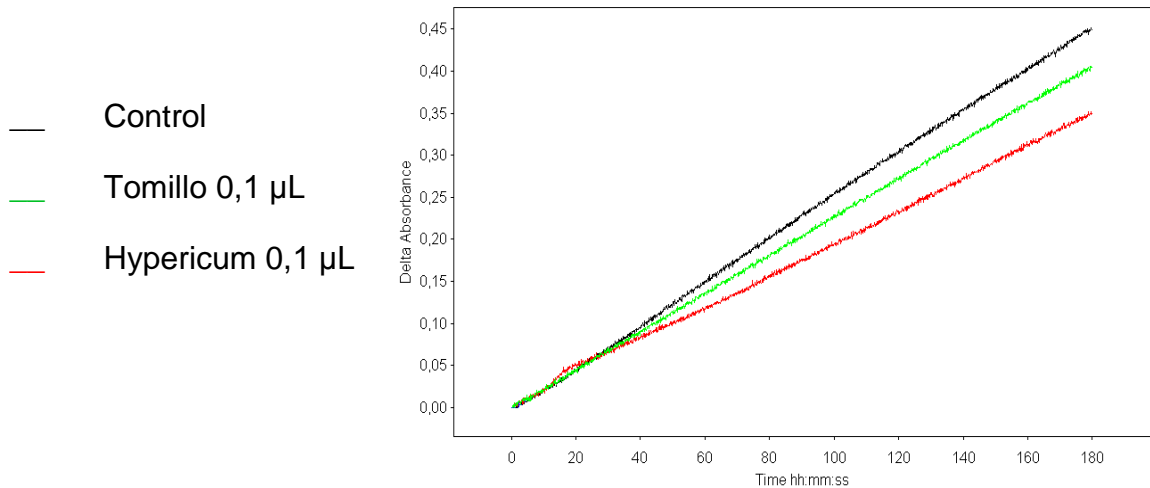


Figura 18. Gráfico experimental de la actividad GSH-transferásica microsómica en presencia del extracto de Hierba de San Juan y de Tomillo. Trazados experimentales de la medición continua del conjugado GSH-DNB durante 3 minutos a 340 nm. Control: actividad medida en ausencia de extracto. Las condiciones experimentales están descritas en Métodos.

Tabla 5. Valores de las pendientes y velocidad de reacción de formación del conjugado GSH-DNB en presencia de los extractos herbales

Condiciones	Pendiente	V
Control	0,154 ± 0,001	160,4 ± 1,3
Tomillo 0,1	0,136 ± 0,003	141,6 ± 3,0
Tomillo 0,2	0,114 ± 0,001	118,7 ± 1,1
Tomillo 0,3	0,102 ± 0,001	106,2 ± 1,3
Hierba de San Juan 0,1	0,115 ± 0,001	119,8 ± 1,2
Hierba de San Juan 0,2	0,088 ± 0,002	91,6 ± 1,6
Hierba de San Juan 0,3	0,083 ± 0,002	86,4 ± 2,3

Pendiente: absorbancia/min/0,1 mg de proteína microsómica. Velocidad: η moles de conjugado formado/min/ mg de proteína microsómica. Las condiciones del ensayo enzimático están descritas en Métodos, Cada valor representa el promedio de al menos 4 experimentos independientes \pm DE.

La Figura 19 muestra un gráfico de dos variables, la capacidad de los extractos de revertir la oxidación de los tioles microsómicos y su capacidad de inhibir la actividad GSH-transferásica microsómica. En ella se observa que se necesitó menor cantidad de η moles de polifenoles del extracto de Tomillo que de Hierba de San Juan para revertir la oxidación de tioles microsómicos. Sin embargo, el extracto de Tomillo, mostró un efecto inhibitorio de la actividad GSH-transferásica menor que el extracto de Hierba de San Juan: la velocidad GSH-transferásica en presencia del extracto de Tomillo fue mayor que en presencia del extracto de Hierba de San Juan (tabla 5). Además, si se observan las razones entre estas dos variables no existe proporcionalidad entre ellas, por lo que no hay una relación directa (tabla 6).

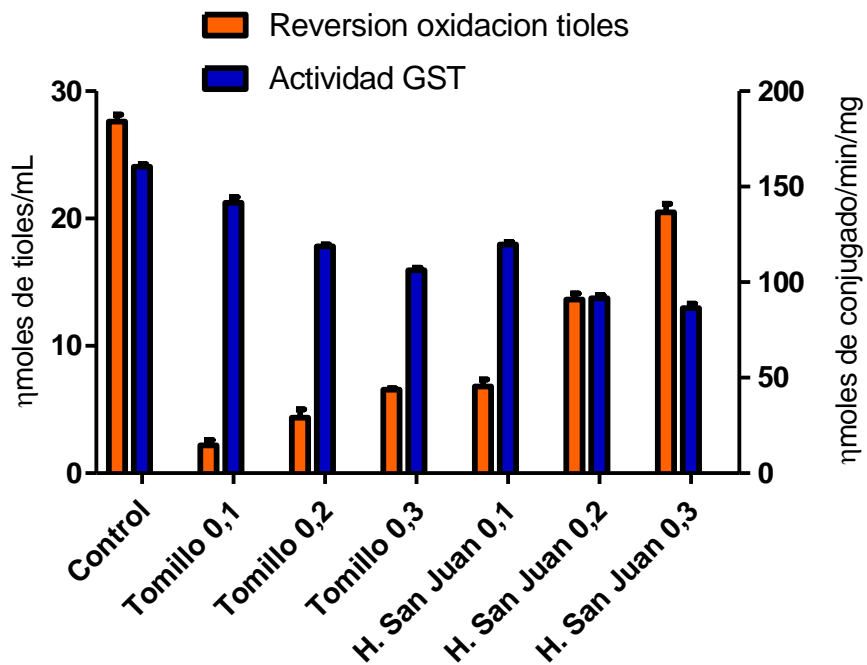


Figura 19. Inhibición de la actividad GSH-transferásica *versus* reversión de la oxidación de tioles microsómicos. Los valores de “reversión oxidación de tioles” se obtuvieron de la Figura 12 y los de “actividad GST”, de la Tabla 5. $p < 0.0001$.

Tabla 6. Razón entre la reversión de la oxidación de tioles microsómicos y la Actividad GST

Extracto	EC ₅₀ Reversión oxidación de tioles	Actividad GST	Actividad GST/ Reversión oxidación de tioles
Control	27,60	160,4	5,81
Tomillo 0,1	2,18	141,6	64,95

Tomillo 0,2	4,36	118,7	27,22
Tomillo 0,3	6,55	106,2	16,21
H. San Juan 0,1	6,82	119,8	17,56
H. San Juan 0,2	13,65	91,6	6,7
H. San Juan 0,3	20,48	86,4	4,21

EC₅₀: concentración de extracto expresada en η moles equivalentes de catequina/0,5 mg de proteína microsómica que previene en un 50% la oxidación microsómica inducida por Fe⁺³/ascorbato. Los valores de la GST corresponden a aquellos mostrados en la tabla 5 y están expresados en η moles de conjugado formado/min/ mg de proteína microsómica.

Capacidad quelante de Cu⁺² de los diferentes extractos. La Figura 20A muestra los espectros de absorbancia de una solución de CuSO₄ 0,5 mM en ausencia y presencia del extracto de Tomillo. El espectro del CuSO₄ presentó un pico de absorbancia a 201 η m con una absorbancia máxima de 1,005 Unidades de absorbancia (UA). Al adicionar 0,1 μ L de extracto de Tomillo a la solución de CuSO₄ 0,5 mM, la absorbancia del pico a 201 η m disminuyó a 0,564 UA y apareció un pico en el rango de 370-450 η m con una absorbancia máxima de 0,017 UA. Al adicionar 0,6 μ L y 0,8 μ L del extracto de Tomillo la absorbancia del pico a 201 η m fue 0,505 UA y 0,466 UA, respectivamente; asimismo, la absorbancia del pico en el rango de 370-450 η m aumento a 0,054 UA y 0,074 UA, respectivamente.

La Figura 20B muestra los espectros de absorbancia de una solución de CuSO_4 0,5 mM en ausencia y presencia del extracto de Hierba de San Juan. Al adicionar 0,1 μL del extracto de Hierba de San Juan a la solución de CuSO_4 0,5 mM se observó una disminución del pico de absorbancia máxima a 201 nm del Cu^{2+} a 0,889 UA y la aparición de un pico a 275 nm cuya absorbancia alcanzó 0,158 UA. Al adicionar 0,6 μL y 1 μL del extracto de Tomillo la absorbancia del pico a 201 nm fue 0,743 UA y 0,699 UA, respectivamente; asimismo, la absorbancia del pico en 275 nm aumento a 0,212 UA y 0,254 UA, respectivamente.

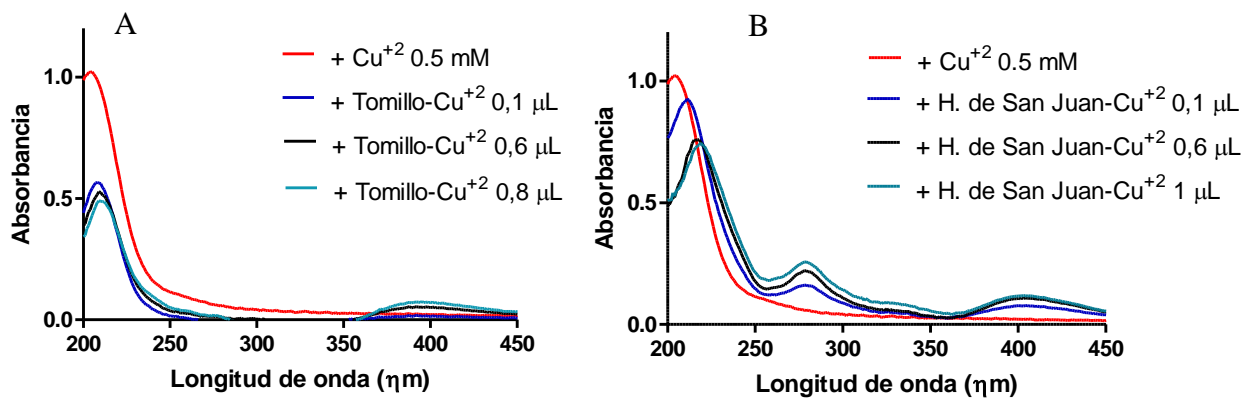


Figura 20. Modificación del espectro de absorbancia de Cu^{2+} en presencia de los extractos herbales. [CuSO_4]: 0,5 mM. La figura representa el espectro experimental obtenido con los extractos de Tomillo (20A) y Hierba de San Juan (20B).

IV. DISCUSIÓN

Actualmente existe un interés mayoritario por terapias antioxidantes provenientes de extractos herbales. El mercado tiene una vasta gama de estos productos, pero existen pocos estudios exhaustivos respecto de su real eficacia. Más aún, hoy existe el convencimiento que en general, todas las patologías, en mayor o menor grado, están asociadas a estrés oxidativo. Como ejemplos de patologías especialmente asociadas a estrés oxidativo descritos en la literatura podemos mencionar diabetes, enfermedades cardiovasculares y neurodegenerativas, y cáncer, entre otras (Fulda y cols., 2010). Por otra parte, muchos extractos herbales se utilizan actualmente como aditivos de alimentos para aumentar sus propiedades benéficas, entre ellas, la capacidad antioxidante. Motivados por estas razones en este trabajo se caracterizaron de acuerdo a las capacidades antioxidantes, dos extractos hidroalcohólicos, uno de Tomillo, planta utilizada principalmente como condimento y el otro de Hierba de San Juan, utilizado como antidepresivo.

Dado que el contenido de polifenoles en las plantas es alto, se determinó su contenido total para luego utilizarlo como marcador de capacidad antioxidante no-enzimática de los extractos. El extracto de Hierba de San Juan presentó un contenido de polifenoles totales aproximadamente 3,0 veces mayor que el extracto de Tomillo (tabla 1). Contrariamente, el extracto de Tomillo presentó una actividad antilipoperoxidante aproximadamente 3 veces mayor que la Hierba de San Juan (tabla 2). De igual forma, Tomillo fue capaz de producir una mayor protección frente a la oxidación de tioles microsómicos que la Hierba de San Juan (tabla 3). Este fenómeno podría deberse a las características físico-químicas de los polifenoles presentes en cada extracto. Así, podrían existir diferencias en la polaridad de los antioxidantes presentes en ambos extractos, como también en el potencial redox de ellos.

Respecto de la reversión de la oxidación de los tioles microsómicos, cabe destacar que biológicamente los compuestos tiólicos son capaces de reducir enlaces disulfuros, una reacción redox que es reversible. Al respecto, Tomillo fue capaz de revertir 2,8 veces más la oxidación de tioles microsómicos que el extracto de Hierba de San Juan (tabla 4). Si bien, ambos extractos previnieron y revirtieron la oxidación de los tioles microsómicos, es necesario hacer notar que compuestos tiólicos como por ejemplo GSH, principal antioxidante no enzimático celular, han mostrado ser capaces de reducir enlaces $-S-S-$. Es probable que los extractos herbales ensayados contengan agentes reductores de grupos $-S-S-$, entre otros, compuestos tiólicos. Estos postulados se ven favorecidos al observar las razones calculadas entre los EC_{50} y la concentración de polifenoles para cada ensayo antioxidante; estas razones mostraron que no existe proporcionalidad entre estas dos variables.

Como se mencionó en la introducción, los circuitos tiólicos están involucrados en múltiples funciones fisiológicas. En el retículo endoplásmico existe una isoforma de la GSH-transferasa, cuya forma nativa activa es el dímero $-S-S-$, por lo que la reducción de este enlace provoca la disminución de la forma activa microsómica de esta enzima (Wilce y cols., 1994). Esta enzima juega un rol muy importante en procesos de detoxificación; ella cataliza la formación de conjugados entre xenobióticos electrofílicos y GSH, producto que sufre 3 reacciones posteriores: se elimina el residuo de glicina y el del gama glutamilo y por último se acetila el residuo de cisteína generando de esta forma ácidos mercaptúricos que son fácilmente eliminables por la orina (Letelier, 2010). El extracto de Hierba de San Juan presentó una mayor capacidad inhibitoria de la GSH-transferasa en comparación con el extracto de Tomillo (figura 18). Estos resultados muestran que además de polifenoles, existen otros agentes reductores capaces de reducir compuestos que poseen enlaces disulfuros. La presencia de estos agentes reductores es de especial importancia para la célula

animal, dado que los circuitos tiólicos se regulan a través de estas reacciones redox (Wouters y cols., 2010; Brosnan y cols., 2008).

Existe otra vía antioxidante, también importante para la célula, que es la capacidad de quelar compuestos metálicos, especialmente hierro y cobre, que en su estado iónico libre, pueden generar EROs a través de las reacciones de Haber-Weiss y/o Fenton. Ambos extractos fueron capaces de quelar Cu^{+2} (figura 20), propiedad medida por la observación de cambios en el espectro del Cu^{+2} provocada en presencia de los extractos herbales. Esta propiedad es de especial importancia para el extracto de Hierba de San Juan, ya que se utiliza como antidepresivo, patología asociada a estrés oxidativo, por lo tanto, la presencia de principios activos antidepresivos como también de antioxidantes en los preparados de esta planta favorecerían la terapia antidepresiva por acción sinérgica de ellos (Gaster y cols., 2000).

Resumiendo, Tomillo presentó mayor capacidad antioxidante que la Hierba de San Juan, aunque este extracto tuvo el menor contenido de polifenoles. Este fenómeno podría deberse a diferencias en lipofilicidad de los agentes antioxidantes presentes en ambos extractos, propiedad que favorecería la afinidad por la membrana microsómica. Por otra parte, también es probable que existan diferencias en los potenciales redox de los antioxidantes herbales favoreciendo a aquellos presentes en el extracto de Tomillo.

Cabe destacar que se utilizaron pequeñas cantidades de extractos para evaluar las actividades antioxidantes testeadas (0,6 – 6 μg equivalentes de catequina/ 0,5 mg de proteína microsómica); esto indicaría que preparados para uso humano de estas plantas podrían ser seguros. Sin embargo, experimentos de toxicidad y posología se requieren previo a la formulación de fitofármacos.

Si bien este es un estudio preliminar, los resultados presentados muestran que desde el punto de vista biológico, los antioxidantes herbales actúan a través de diferentes mecanismos que podrían mostrar una acción sinérgica frente su actividad antioxidante celular.

V. CONCLUSIONES

Los extractos de Tomillo y Hierba de San Juan se comportaron como antioxidantes en diferente magnitud. Así, el extracto de Tomillo mostró una actividad antilipoperoxidante microsómica 2,7 veces mayor que el extracto de Hierba de San Juan, valor que se corresponde con la diferencia observada en la concentración de polifenoles de ambos extractos. Asimismo, la capacidad del extracto de Tomillo para prevenir y revertir la oxidación de los tioles proteicos microsómicos fue 3,5 veces y 2,8 veces mayor respectivamente, que la de la hierba de San Juan.

Por otra parte, la Hierba de San Juan fue capaz de inhibir la actividad GSH-transferásica, reacción catalizada por la forma dimérica –S-S- de la enzima, en mayor magnitud que el Tomillo. Así, el extracto de Tomillo y el de Hierba de San Juan inhibieron un 34% y un 46% esta actividad enzimática, respectivamente.

VI. PROYECCIONES

Los preparados herbales utilizados en el tratamiento de patologías neurodegenerativas tienen dos características: su acción directa sobre el sistema nervioso central y su actividad antioxidante. Este sería el caso de la Hierba de San Juan. Respecto al extracto de Tomillo se necesitan mayores estudios para definir sus posibles actividades psicotrópicas. Los resultados muestran la presencia de compuestos lipofílicos en el extracto de Tomillo; la lipofilicidad es una característica fisicoquímica indispensable para compuestos que deben atravesar la barrera hematoencefálica para desarrollar su acción sobre el sistema nervioso central. Sin embargo, esta característica no es suficiente para la acción terapéutica de este extracto, por lo que nuevos

estudios se están desarrollando en el laboratorio para evaluar su posible actividad psicotrópica.

VII. REFERENCIAS

- Albert D, Zundorf I, Dingermann T, Muller W, Steinhilber D and Werz O. Hyperforin is a dual inhibitor of cyclooxygenase-1 and 5-lipoxygenase. *Biochem Pharmacol.*; 64(12), p.1767-1775. Dec 15, (2002).
- Banerjee R. Redox biochemistry. Wiley-Interscience, Hoboken, NJ A John Wiley & Sons, Inc, Publication. (2008).
- Baranauskiene R, Venskutonis P, Viskelis P and Dambrauskiene E. Influence of nitrogen fertilizers on the yield and composition of thyme (*Thymus vulgaris*). *Journal of Agricultural and food chemistry.* 51: 7751-58. (2003).
- Benzie IF. Evolution of antioxidant defence mechanisms. *Eur J Nutr* 39: 53-61. (2000).
- Bors W and Michel C. Chemistry of the antioxidant effect of polyphenols. *Ann N Y Acad Sci* 957: 57-69. (2002).
- Bouchberg MS, Allegrini J, Bessiere C, Attisso M, Passet J and Granger R. *Rivista Ital.* 58 527–536. (1976).
- Brosnan JT and Brosnan ME.. Glutathione and the Sulfur-Containing Amino Acids: An Overview, in *Glutathione and Sulfur Amino Acids in Human Health and Disease* (eds R. Masella and G. Mazza). John Wiley & Sons, Inc. Hoboken. NJ. USA. (2008).
- Bruneton J. Fitoquímica, Plantas medicinales. 2ª edición. Editorial Acribia. pp540-541. (2001).
- Cañigual S and Vanaclocha B. Usos terapéuticos del Tomillo. *Revista de Fitoterapia.* I: 5-13. (2000).

- Cañigüeral S, Vila R, Wichtl M. Eds. *Plantas Medicinales y Drogas Vegetales*. Milano: OEMF, (2000).
- Chao SC, Young DG, Oberg C and Essent J. *Oil Res.* 12, 639–649. (2000)
- Cohen P.A., Hudson J.B., Towers G.H., Antiviral activities of anthraquinones, bianthrone and hypericin derivatives from lichens. *Experientia*. Feb 15;52(2). (1996).
- De Gara L, Locato V, Dipierro S and de Pinto MC. Redox homeostasis in plants. The challenge of living with endogenous oxygen production. *Respir Physiol Neurobiol* 173. Suppl: S13-19. (2010).
- Deneke SM. Thiol-based antioxidants. *Curr Top Cell Regul* 36: 151-180. (2000).
- Didry N, Oubrevil L and Pinkas M. Activity of thymol, carvacrol, cinnamaldehyde and eugenol on oral bacteria. *Pharm. Acta Helv.* 69: 25. (1994).
- Escop, European Scientific Cooperative on Phytotherapy, monographs on the medicinal uses of plant drugs, 180-183. (1996).
- Formáček V and Kubeczka KH. *Essential oils Analysis by Capillary Gas Chromatography Carbon-13 NMR Spectroscopy*, Chichester. John Wiley & Sons. (1982).
- Fulda S, Galluzzi L and Kroemer G. Targeting mitochondria for cancer therapy. *Nature reviews*, volume 9. June, 447-464. (2010).
- Halliwell B and Gutteridge J. *Free Radicals in Biology and Medicine*. Third edition. Oxford University Press. 36, 104. (2004).

- Horne D, Holm M, Oberg C and Essent J. *Oil Res.* 13, 387–392. (2001).
- Jones DP. Radical-free biology of oxidative stress. *Am J Physiol Cell Physiol* 295: C849-868. (2008).
- Juven Bj y cols. Factors that interact with the antibacterial action of thyme essential oil and its active constituents. *J. Appl. Bacteriol.* 76: 626-31. (1994).
- Klaassen CD and Reisman SA. Nrf2 to the rescue: effects of the antioxidative/electrophilic response on the liver. *Toxico Appl Pharmacol* 244: 57-65. (2010).
- Kornas A, Kuzniak E, Slesak I and Miszalski Z. The key role of the redox status in regulation of metabolism in photosynthesizing organisms. *Acta Biochim Pol* 57: 143-151. (2010).
- Letelier ME. Comparative effects of superoxide anion and hydrogen peroxide on microsomal and cytosolic glutathione S-transferase activities of rat liver. *Biol Trace Elem Res* 134: 203–211. (2010).
- Letelier ME. 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: 110–120. (2009).
- Letelier ME. Possible mechanisms underlying copper-induced damage in biological membranes leading to cellular toxicity. *Chem Biol Interact* 151: 71–82. (2008).
- Leung AY and Foster S. *Encyclopaedia of Common Natural Ingredients Used in Food, Drugs, and Cosmetics.* John Wiley & Sons. New York. 492. (1996).

- Lowry OH. Protein measurement with the Folin phenol reagent. J Biol Chem 265–275. (1951).
- Mateo C, Monera MP, Sanz J, Calderón J and Hernández A. Estudio analítico de aceites esenciales provenientes de palantas españolas. Especies de género *Thymus*. Riv. Ital. E.P.P.O.S. 60: 621-627. (1978).
- Micromedex, altmeddex RPS herbal medicines: a guide for health-care professionals: St. John`s Wort, (2005).
- Müller-Limmroth W and Frölich H. Wirkungsnachweis einiger phytotherapeutisch expectorantien auf den mukoziliaren transport. Fortschr. Med 98: 95-101. (1980).
- Newcomb M and Chandrasena RE. Highly reactive electrophilic oxidants in cytochrome P450 catalysis. Biochem Biophys Res Commun 338: 394-403. (2005).
- PDR, PRD for Herbal Medicine. 1ª Edición, 905-908. (1998)
- Peris JB, Stubing G and Vanaclocha B. Formulas magistrales, En Arteché. A (Dir), Fitoterapia, Vademecum de prescripción, Barcelona: Masson, (1998).
- Proença A and Salgueiro L. The chemical polymorphism of *Thymus zygis* ssp. *Sylvestris* from Portugal, J Ess. Oil Res. 3: 409-412. (1991).
- Richard H, Benjalali B, Banquor N and Bantaux O. Study of various essential oils thyme from Morocco. Lebensm. Wiss. Technol. 18: 105-110. (1985).
- Schafer FQ and Buettner GR. Redox environment of the cell as viewed through the redox state of the glutathione disulfide/glutathione couple. Free Radic Biol Med 30: 1191-1212. (2001).

- Sies H. Polyphenols and health: update and perspectives. Arch Biochem Biophys 501: 2-5. (2010).
- Silveira B, Ferreres B, Malvar J and Dias A. Phytochemical and antioxidant characterization of *Hypericum perforatum* alcoholic extracts. Elsevier, Volume 90, Issues 1–2. April, 157–167. (2005)
- Simeon de Bouchberg M, Allegrini J, Bessiere C, Attisso M, Passet J and Granger R. Propriétés microbiologiques des huiles essentielles de chimiotypes de *Thymus vulgaris*. Riv. Ital. E.P.P.O.S. 58: 527-536. (1976).
- St John's Wort. *Hypericum perforatum*. Pest plant risk assessment. Queensland. Agosto, (2008).
- Wilce, M.C & Parker, M.W. Structure and function of glutathione S-transferases. Biochim. Biophys. Acta., 1-18. (1994).
- Wouters MA, Fan SW and Haworth NL. Disulfides as redox switches: from molecular mechanisms to functional significance. Antioxid Redox Signal 12: 53-91. (2010).
- Wu G, Fang YZ, Yang S, Lupton JR and Turner ND. Glutathione metabolism and its implications for health. J Nutr 134: 489-492. (2004).