

UNIVERSIDAD DE CHILE
Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas



**ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE DE EXTRACTOS
ESTANDARIZADOS DE HOJAS DE MATICO Y LLANTÉN
Y SU EFECTO SOBRE LA CAPACIDAD ANTIOXIDANTE
PLASMÁTICA Y LOS NIVELES BASALES DE MDA
PLASMÁTICOS EN RATAS TRATADAS ORALMENTE
CON ESTOS EXTRACTOS**

Tesis presentada a la Universidad de Chile para optar al grado de
Doctor en Farmacología

ANDREA JULIETA MÜLLER SEPÚLVEDA

Directores de Tesis:
María Eugenia Letelier Muñoz
Iván Saavedra Saavedra

Santiago, Chile
2015

La tesis que aquí se presenta fue desarrollada en el Laboratorio de Farmacología y Toxicología del Departamento de Química Farmacológica y Toxicológica de la Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas de la Universidad de Chile, en conjunto con el Centro de Investigaciones Farmacológicas y Toxicológicas (IFT) de la Facultad de Medicina de la Universidad de Chile. Contó con el apoyo instrumental del Laboratorio Obens Ltda. a cargo del Sr. Eduardo Sebik y Humberto Oliver y el Laboratorio de Farmacología de la Facultad de Ciencias Veterinarias y Pecuarias (FARMAVET), a cargo de la Dra. Betty San Martín.

La realización de esta investigación tuvo el siguiente apoyo y financiamiento:

- Beca para estudios de Doctorado en Chile. CONICYT 2010-2014 (Beca N° 21100090)
- Beca de Apoyo a la realización de Tesis Doctoral. CONICYT 2012-2014 (Beca N° 4121481)
- Beca de Asistencia para Congresos Nacionales Año 2011 y Año 2013.

Durante la ejecución de la Tesis, se han realizado diversas actividades de difusión de los principales resultados obtenidos, a través de Congresos nacionales e internacionales, Jornadas de Investigación y Publicaciones.

Congresos y Jornadas:

- **Müller-Sepúlveda A.J., Saavedra I.; Letelier M.E. Estudios Farmacocinéticos de preparados naturales: importancia de estos estudios para la fitoterapia en humanos y animales.** XXXIII Congreso Anual de la Sociedad de Farmacología de Chile. 16 al 19 de Noviembre de 2011. Revista de Farmacología, Volumen 4, número 1, página 82.

- **Müller A., Saavedra I.; Letelier M.E. Estudios *in vitro* del efecto antioxidante de extractos de *Buddleja globosa* Hope y *Plantago major* L.** XVI Aniversario del Instituto de Ciencias Biomédicas (ICBM) de la Facultad de Medicina: Aportes del ICBM a las Ciencias Biomédicas. Miércoles 4 y Jueves 5 de Septiembre de 2013. Libro de Resúmenes, página 22.
- **Müller-Sepúlveda A.J., Saavedra I.; Letelier M.E. Relation between *in vitro* antioxidant capacity and plasmatic antioxidant capacity of hidroalcoholic extracts of *Buddleja globosa* Hope and *Plantago major* L.** VI International Conference on Polyphenols and Health. 16 al 19 de Octubre de 2013. Libro de Resúmenes, página 60.
- **Müller-Sepúlveda A.J., Saavedra I.; Letelier M.E. Estudios *in vitro* del efecto antioxidante de extractos de *Buddleja globosa* Hope y *Plantago major* L.** XXXV Congreso de la Sociedad de Farmacología de Chile. 27 al 30 de Noviembre de 2013. Revista de Farmacología, Volumen 6, número 3, página 88.
- **Müller, Andrea; Saavedra, Iván; Letelier, María Eugenia. Estudios *in vitro* de la capacidad antioxidante de extractos de *Buddleja globosa* Hope y *Plantago major* L.** II Congreso Latinoamericano de Plantas Medicinales. 12 al 14 de Agosto de 2014. Pendrive de resúmenes.
- **Müller, Andrea; Saavedra, Iván; Letelier, María Eugenia. Relación de la concentración plasmática de polifenoles sobre la capacidad antioxidante de extractos de *Buddleja globosa* Hope y *Plantago major* L.** Jornadas de Postgrado. Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas. Universidad de Chile. Agosto de 2014.

Publicaciones:

Andrea Müller-Sepúlveda; Iván Saavedra; María Eugenia Letelier. **Plasmatic antioxidant capacity as a possible marker of phytodrugs efficacy.** International Journal of Phytomedicine (manuscrito aceptado).

Andrea Müller-Sepúlveda; María Eugenia Letelier; Betty San Martín; Iván Saavedra. **Simultaneous determination of different flavonoids in human plasma by a simple HPLC assay.** Journal of The Chilean Chemical Society (manuscrito enviado).

ÍNDICE	Página
ÍNDICE DE CONTENIDOS	i
ÍNDICE DE TABLAS	iv
ÍNDICE DE FIGURAS	vi
ABREVIATURAS	x
RESUMEN	xi
ABSTRACT	xiv
1. INTRODUCCIÓN	1
1.1. PLANTAS MEDICINALES.....	1
1.2. ESTUDIOS FARMACOCINÉTICOS.....	6
1.2.1. Puntos críticos en estudios preclínicos.....	8
1.3. POLIFENOLES HERBALES.....	10
1.3.1. Polifenoles y sus mecanismos antioxidantes.....	14
1.4. ESPECIES VEGETALES.....	16
2. HIPÓTESIS	20
3. OBJETIVOS	21
3.1. OBJETIVO GENERAL.....	21
3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	21
3.2.1. Determinar la concentración total de polifenoles y tioles de los extractos herbales.....	21
3.2.2. Evaluar la capacidad antioxidante <i>in vitro</i> de los extractos herbales.....	21
3.2.3. Implementar un método HPLC, para determinar el perfil de los compuestos fenólicos presentes en los extractos herbales.....	21

3.2.4. Determinar por el método HPLC la concentración de polifenoles plasmáticos en ratas Sprague-Dawley tratadas con diferentes dosis orales de los extractos herbales.....	21
3.2.5. Evaluar la capacidad reductora de hierro y la concentración de malondialdehído en el plasma de ratas tratadas oralmente con los extractos herbales.....	22
4. MATERIALES Y MÉTODOS.....	23
4.1. MATERIALES.....	23
4.1.1. Reactivos.....	23
4.1.2. Obtención de la droga vegetal.....	24
4.2. MÉTODOS.....	29
4.2.1. Animales de experimentación.....	29
4.2.2. Preparación de microsomas hepáticos.....	29
4.2.3. Cuantificación de polifenoles totales.....	30
4.2.4. Cuantificación de tioles totales.....	31
4.2.5. Condiciones oxidativas experimentales.....	33
4.2.6. Lipoperoxidación microsómica.....	33
4.2.7. Oxidación de tioles microsómicos.....	34
4.2.8. Isobogramas.....	35
4.2.9. Quelación de Cu^{2+}	36
4.2.10. Actividad GSH-transferásica microsómica.....	36
4.2.11. Tratamiento oral de los animales con los extractos de matico y llantén.....	38
4.2.12. Estudios Toxicológicos.....	40
4.2.13. Obtención de las muestras de plasma.....	42
4.2.14. Capacidad plasmática reductora de hierro (FRAP).....	43

4.2.15. Determinación de malondialdehído plasmático (MDA)...	44
4.2.16. Análisis estadístico.....	45
5. RESULTADOS.....	46
5.1. Concentración de polifenoles y tioles totales de los extractos herbales de matico y llantén.....	46
5.2. Capacidad antioxidante <i>in vitro</i> de los extractos herbales de matico y llantén.....	49
5.3. Implementación de un método HPLC, para cuantificar compuestos fenólicos presentes en plasma.....	71
5.4. Cuantificación de polifenoles plasmáticos en ratas Sprague-Dawley tratadas con diferentes dosis orales de los extractos de matico y llantén.....	95
5.5. Capacidad antioxidante plasmática en ratas Sprague-Dawley tratadas con diferentes dosis orales de los extractos de matico y llantén.....	118
6. DISCUSIÓN.....	126
7. CONCLUSIONES.....	140
8. BIBLIOGRAFÍA.....	141
9. ANEXOS.....	149
9.1. Certificado de Análisis del extracto de Matico y Llantén, Laboratorios Ximena Polanco.....	149
9.2. Certificado Comité de Bioética.....	151
9.3. Espectros LC/MS/MS de los estándares de polifenoles.....	152

ÍNDICE DE TABLAS	Página
Tabla 1 Caracterización de los extractos herbales en estudio.....	48
Tabla 2 Caracterización de la capacidad antioxidante <i>in vitro</i> de los extractos herbales de matico y llantén.....	54
Tabla 3 Capacidad de los extractos de matico y llantén de revertir la oxidación de tioles microsómicos.....	57
Tabla 4 Oxidación de lípidos y tioles microsómicos inducida por Cu ²⁺ /ascorbato en presencia de GSH y catequina.....	61
Tabla 5 IC ₅₀ para la inhibición de la actividad GST microsómica inducida por el extracto de matico y llantén, ditioneitol (DTT), N-acetil-cisteína (NAC) y cisteína.....	65
Tabla 6 Condiciones Cromatográficas del método HPLC.....	74
Tabla 7 Tiempos de retención y longitudes de onda máxima de los picos de los analitos seleccionados.....	84
Tabla 8 Rango de concentraciones de los estándares y de los extractos herbales testeadas para la construcción de las curvas de calibración.....	90
Tabla 9 Resumen de parámetros analíticos de las curvas de calibración de los estándares de polifenoles utilizados.....	91
Tabla 10 Evaluación de interferentes en las muestras de plasma.....	100
Tabla 11 Exactitud, error y coeficiente de variación de las mediciones realizadas para apigenina-7-glucósido.....	102
Tabla 12 Exactitud, error y coeficiente de variación de las mediciones realizadas para rutina.....	102
Tabla 13 Especificaciones técnicas empleadas para caracterizar las moléculas de los estándares de polifenoles por espectrometría de masas.....	104
Tabla 14 Iones madre, fragmentos y potenciales de los estándares de polifenoles determinados por espectrometría de masa.....	110

Tabla 15	Condiciones cromatográficas del equipo HPLC acoplado a LC/MS/MS.....	111
Tabla 16	Significado estadístico de los valores de capacidad plasmática reductora del hierro tras la administración oral del extracto de matico y llantén.....	125
Tabla 17	Significado estadístico de los valores de concentración de malondialdehído plasmático tras la administración oral del extracto de matico y llantén.....	125

ÍNDICE DE FIGURAS		Página
Figura 1	Estructura química de diferentes polifenoles.....	11
Figura 2	Flores y hojas de <i>Buddleja globosa</i> Hope (A) y <i>Plantago major</i> L (B).....	18
Figura 3	Reacción de Schivata.....	27
Figura 4	Reacción de taninos con cloruro férrico.....	27
Figura 5	Estructura química de (A) anisaldehído y (B) saponina...	28
Figura 6	Reacción de Ellman.....	32
Figura 7	Reacción del ácido tiobarbitúrico.....	34
Figura 8	Reacción enzimática entre GSH y DNB catalizada por la GSH-transferasa (GST).....	37
Figura 9	Protocolo de tratamiento de los animales.....	40
Figura 10	Modo de Identificación de las jaulas de los animales bajo tratamiento.....	42
Figura 11	Efecto de los extractos de matico (A) y llantén (B) sobre la lipoperoxidación microsómica inducida por Cu ²⁺ /ascorbato.....	52
Figura 12	Efecto de los extractos de matico (A) y Llantén (B) sobre la prevención de la oxidación del contenido de tioles microsómicos inducido por Cu ²⁺ /ascorbato.....	53
Figura 13	Efecto de los extractos de matico (A) y Llantén (B) sobre la reversión de la oxidación del contenido de tioles microsómicos inducido por Cu ²⁺ /ascorbato.....	56
Figura 14	Isobogramas de la inhibición de la lipoperoxidación microsómica en presencia de los extractos de matico y llantén.....	59
Figura 15	Isobogramas de la protección de tioles microsómicos de la oxidación en presencia de los extractos de matico y llantén.....	60

Figura 16	Quelación de Cu^{2+} en presencia de los extractos de matico y llantén.....	63
Figura 17	Efecto del extracto de matico sobre la inhibición de la actividad GST microsómica.....	66
Figura 18	Efecto del extracto de llantén sobre la inhibición de la actividad GST microsómica.....	67
Figura 19	Efecto de ditioneitol (DTT) sobre la inhibición de la actividad GST microsómica.....	68
Figura 20	Efecto de N-acetil-cisteína (NAC) sobre la inhibición de la actividad GST microsómica.....	69
Figura 21	Efecto de cisteína sobre la inhibición de la actividad GST microsómica.....	70
Figura 22	Estructura química de los estándares utilizados.....	72
Figura 23	Gradiente de solventes utilizada como fase móvil.....	75
Figura 24	Cromatograma de los estándares de polifenoles determinados a 280 nm.....	78
Figura 25	Cromatograma de los extractos de matico (A) y llantén (B) determinado a 280 nm.....	79
Figura 26	Cromatograma de barrido de los diferentes estándares..	81
Figura 27	Cromatograma de barrido del extracto de matico.....	82
Figura 28	Cromatograma de barrido del extracto de llantén.....	83
Figura 29	Preparación de la muestra de plasma para su inyección en el equipo HPLC.....	86
Figura 30	Cromatograma HPLC de plasma humano en presencia de catequina determinado a 280 nm.....	87
Figura 31	Cromatograma de la mezcla de estándares solubilizados en plasma determinado a 280 nm.....	88
Figura 32	Cromatograma de matico (A) y llantén (B) en plasma determinado a 280 nm.....	89

Figura 33	Curvas de calibración de los estándares de polifenoles utilizados disueltos en plasma.....	92
Figura 34	Curvas de calibración para el extracto de matico disuelto en plasma.....	93
Figura 35	Curvas de calibración para el extracto de llantén disuelto en plasma.....	94
Figura 36	Cromatograma de plasma de rata del grupo control determinado a 280 nm.....	96
Figura 37	Cromatograma de plasma de rata tratada con extracto de matico determinado a 280 nm.....	97
Figura 38	Cromatograma de plasma de rata tratada con extracto de llantén determinado a 280 nm.....	97
Figura 39	Esquema de los componentes de un equipo LC/MS/MS triple cuadrupolo.....	105
Figura 40	Espectro completo de la infusión de catequina 1 µg/mL	107
Figura 41	Espectro aislado del ion madre del estándar de catequina.....	108
Figura 42	Espectro de la fragmentación del ion madre del estándar de catequina.....	108
Figura 43	Espectro aislado de los fragmentos del estándar de catequina (109, 203 y 245).....	109
Figura 44	Cromatogramas LC/MS/MS de los iones seleccionados para cada estándar en los extractos de matico y llantén..	113
Figura 45	Capacidad plasmática reductora del hierro y MDA plasmático tras la administración oral de agua al grupo control.....	122
Figura 46	Capacidad plasmática reductora del hierro y MDA plasmático tras la administración oral del extracto de matico.....	123

Figura 47	Capacidad plasmática reductora del hierro y MDA plasmático tras la administración oral del extracto de llantén.....	124
Figura 48	Diagrama del estrés oxidativo sobre el sistema inmune...	127

ABREVIATURAS

ATB	Ácido tiobarbitúrico
ATC	Ácido tricloroacético
ATNB	ácido 5-tio-2-nitrobenzoico
csp	cantidad suficiente para
DNB	1-chloro-2,4-dinitrobenzeno
DTNB	Disulfuro, ácido 5,5'-ditiobis-(2-nitrobenzoico)
DTT	Ditiotreitol
EROs	Especies Reactivas al Oxígeno
FRAP	Capacidad reductora de hierro plasmático
GSH	Glutación reducido
GST	Glutación transferasa
HPLC	del inglés <i>High Performance Liquid Chromatography</i> (Cromatografía Líquida de Alta Resolución)
IC₅₀	Concentración que inhibe el 50% del efecto observado
MDA	Malondialdehído
NAC	N-acetil-cisteína
OMS	Organización Mundial de la Salud
SOD	Superóxido dismutasa
CCF	Cromatografía en capa fina
TNB	Ácido 5-tionitrobenzoico
TPTZ	2,4,6-tripiridil-s-triazina

RESUMEN

La importancia mundial que hoy tienen las plantas medicinales ha fomentado el desarrollo de fitofármacos por las compañías farmacéuticas. A diferencia de los fármacos sintéticos, las etapas para el desarrollo de fitofármacos (formulaciones que contienen extractos de hierbas polivalentes), no están claramente definidos, estandarizados y normalizados. Estas preparaciones a base de hierbas son muy diversas y los estudios farmacocinéticos y farmacodinámicos de ellos son escasos. De ahí la importancia de la normalización de los procesos que intervienen en la obtención de extractos herbales y fitofármacos, así como la determinación de la dosis, la seguridad y la eficacia de fitofármacos.

El estudio de los parámetros farmacocinéticos requiere datos experimentales, que se resumen en las curvas de dosis-respuesta. En estas curvas se representa la concentración plasmática del fármaco en función del tiempo después de su administración. La concentración individual de principios activos en los extractos de hierbas es muy baja, por lo que es difícil su cuantificación plasmática utilizando los métodos de HPLC clásicos. Asimismo, se ha observado que existe una correlación directa entre la concentración plasmática de los principios activos presentes en un fármaco con los efectos farmacológicos observados. Si se acepta esta correlación, la cuantificación del principio activo podría ser reemplazado por cualquier efecto medible en plasma.

Las hojas de las plantas en general, poseen un alto contenido de antioxidantes, siendo mayoritarios los compuestos polifenólicos. Existen diversas publicaciones que indican que estos compuestos ejercen diferentes efectos farmacológicos relacionados con su actividad antioxidante. Así, preparados de ellos se han asociado a la terapia clásica de patologías tales como enfermedades cardiovasculares y neurodegenerativas (16, 62, 64).

Considerando los antecedentes expuestos, en este trabajo se utilizaron extractos hidro-alcohólicos de hojas de *Buddleja globosa* Hope (matico) y *Plantago major* L. (llantén). Extractos hidro-alcohólicos de matico y llantén, previamente caracterizados por su actividad antioxidante *in vitro*, fueron administrados oralmente a ratas Sprague-Dawley. El análisis de la capacidad antioxidante plasmática a través del tiempo, mostró un aumento de la capacidad de reducir hierro y una disminución de la concentración plasmática de malondialdehído, producto de la oxidación de los lípidos celulares. Por otra parte, el análisis cromatográfico (HPLC) del plasma de las ratas, no mostró los picos correspondientes a los marcadores polifenólicos seleccionados para cada planta (estándares de polifenoles).

Como una forma de detectar la presencia de los marcadores seleccionados en los extractos, muestras de los extractos fueron analizadas por LC-masa. Los cromatogramas obtenidos por este método mostraron la presencia en los

extractos de los marcadores seleccionados; por lo tanto, la no aparición de ellos en los cromatogramas HPLC confirma la falta de sensibilidad del método HPLC implementado para cuantificar tan pequeñas cantidades de principios activos. El aumento de la capacidad antioxidante plasmática sin embargo, demuestra que hubo absorción de los antioxidantes presentes en las dosis orales de los extractos herbales administradas a las ratas. Estos resultados nos permiten postular que para determinar los parámetros farmacocinéticos de fitofármacos, la determinación del efecto farmacológico, en este caso el efecto antioxidante, podría reemplazar a la concentración plasmática.

Cabe destacar que este trabajo representa el primer intento para determinar parámetros farmacocinéticos de fitofármacos, preparados herbales polivalentes. Sin embargo, se necesitan nuevos experimentos que permitan estandarizar las condiciones experimentales implementadas de tal forma que esta metodología pueda ser utilizada en el estudio farmacocinético de fitofármacos.

ABSTRACT

The global importance now given to medicinal plants has encouraged the development of phytodrugs by pharmaceutical companies. Different to synthetic drugs, the stages for the development of phytodrugs (formulations containing polyvalent herbal extracts), are not clearly defined, standardized and normalized. These herbal preparations are very diverse and the pharmacokinetics and pharmacodynamics studies of them are scarce. Hence the importance of standardizing the processes involved in obtaining herbal extracts and phytodrugs, as well as, the dosage, safety and efficacy of phytodrugs.

The study of pharmacokinetic parameters requires experimental data, which are summarized in dose-response curves. These curves plot the plasmatic drug concentration versus time after administration. The individual concentration of active ingredients in herbal extracts are very low, so their plasmatic quantification is difficult using the classic HPLC methods. It has been observed that there is a direct correlation between plasma concentrations of the active ingredients present in a drug with the pharmacological effects observed. If this correlation is accepted, the quantification of the active ingredient could be replaced by any measurable effect on plasma.

In general, the leaves of plants have a high content of antioxidants, being polyphenolic compounds the major constituents. There are different publications indicating that these compounds have many pharmacological effects related to its antioxidant activity. This is the reason why the use of herbal preparations has been associated with conventional therapy of diseases such as cardiovascular and neurodegenerative (16, 62, 64).

Considering the above, this study used hydro-alcoholic extracts of leaves of *Buddleja globosa* Hope (matico) and *Plantago major* L. (llantén). Hydro-alcoholic extracts of matico and llantén, previously characterized for their *in vitro* antioxidant activity, were orally administered to Sprague-Dawley rats. Analysis of plasma antioxidant capacity over time showed an increase in the ability to reduce iron and a decreased in the concentration of plasmatic malondialdehyde, product of cellular lipid oxidation. Moreover, chromatographic analysis (HPLC) of rat's plasma showed no peak corresponding to the polyphenolic markers selected for each plant (polyphenols standards).

As a way to detect the presence of polyphenols markers, extract samples were analyzed by LC-mass chromatography. The chromatograms obtained by this method showed the presence of the selected markers in the extracts; therefore, the non-appearance of them in the HPLC chromatograms confirms the lack of sensitivity of the HPLC method implemented to quantify such small amounts of

active principles. The increase in plasma antioxidant capacity however, shows absorption of antioxidant compounds present in the oral doses of herbal extracts given to rats. These results allow us to postulate that to determine the pharmacokinetic parameters of phytodrugs, determination of pharmacological effect, in this case the antioxidant effect, could replace the determination of plasmatic concentration levels.

It is worthy to note that this work represents the first attempt to determine pharmacokinetic parameters of phytodrugs (polyvalent herbal preparations). However, further experiments to standardize experimental conditions implemented so that this methodology can be used in pharmacokinetic studies of phytodrugs, are needed.

1. INTRODUCCIÓN

1.1. PLANTAS MEDICINALES

Las plantas medicinales hoy en día han adquirido gran importancia no sólo en Chile sino en todo el mundo. Ello probablemente se debe a que juegan un importante papel en el desarrollo socio-cultural y en las necesidades de salud de las zonas urbanas y rurales. Según la Organización Mundial de la Salud (OMS), 65 - 80% de la población mundial de países en desarrollo, depende de las plantas y de sus propiedades curativas, como fuente primaria del cuidado de la salud. Esto se debe principalmente a la pobreza y a la falta de acceso a la medicina moderna, lo que hace que los medicamentos sobre la base de hierbas sean fácilmente accesibles y de bajo costo (13). Sin embargo, existen varios problemas debido al uso masivo que se hace de las plantas medicinales y la escasa información científica que se dispone de los preparados que se distribuyen comercialmente, como son: falta de normas de calidad, falta de directrices para buenas prácticas de fabricación, datos incompletos de seguridad y eficacia, escasez de estudios clínicos, etc. (91, 92).

Latinoamérica posee una rica flora de plantas medicinales, la cual representa el 60% de la biodiversidad del mundo vegetal, así como los conocimientos tradicionales de su uso como remedios herbarios. Esto significa que existe un enorme recurso que aún no ha sido explorado a fondo, generando que la

industria farmacéutica en base de plantas, sea incipiente. Cabe destacar que existen varios factores que han obstaculizado el desarrollo de este sector, mencionando: la falta de conciencia de los beneficios médicos y socio-económicos de esta industria, como también, de conocimientos técnicos; la resistencia a la prescripción de fitofármacos; la falta de una política nacional y sectorial, como también, de procedimientos de control de calidad y métodos de normalización; dificultad en la disponibilidad de grandes cantidades de plantas medicinales de alta calidad; falta de tecnología farmacéutica y validación terapéutica de los preparados; etc. Por otra parte, la legislación para el registro de fitofármacos en Latinoamérica es muy heterogénea y varía mucho de país a país. En este sentido, el conocimiento de los aspectos reglamentarios de los medicamentos sobre la base de hierbas puede ayudar a mejorar la normativa internacional y promover el comercio entre países (91, 92).

La definición de fitofármaco de la OMS y aprobada en Chile, corresponde a: *“Son productos medicinales acabados y etiquetados cuyos ingredientes activos estandarizados, están formados por partes aéreas o subterráneas de plantas u otro material vegetal, o combinaciones de éstos, en estado bruto o en forma de preparaciones vegetales. Por material vegetal se entiende: jugos, resinas, aceites vegetales y cualquier otra sustancia de naturaleza semejante”* (57).

En la naturaleza existen muchas plantas que presentan diversas actividades benéficas tanto para el hombre como para los animales. Los principios activos medicinales de las plantas se pueden encontrar en las hojas, tallos, raíces, corteza, flores, semillas y/o en los frutos. Estos compuestos generalmente se clasifican de acuerdo a su estructura química, en la cual un núcleo químico se repite en una familia de compuestos, ej. polifenoles, alcaloides, procianidinas, etc. Al respecto podemos mencionar que existe reconocido consenso que el núcleo fenólico sería el responsable de la actividad antioxidante de los compuestos polifenólicos (23).

Las propiedades terapéuticas que se le asignan a los preparados herbales que se comercializan son muy diversas, destacando propiedades antioxidantes, anti-cancerígenas, anti-trombóticas, antiinflamatorias, analgésicas, antimicrobianas, entre otras (2, 17, 32, 69). Sin embargo, en la mayoría de los casos no existen estudios clínicos que avalen la eficacia de los efectos terapéuticos y tampoco la seguridad de estos preparados, lo cual ha impedido el uso de ellos, particularmente en atención primaria.

Desde el punto de vista farmacológico, diversos grupos científicos piensan que los preparados herbales polivalentes deben ser evaluados bajo las mismas normas establecidas para los medicamentos alopáticos constituidos por un solo principio activo, aunque existen grandes diferencias entre los fármacos

sintéticos y los fitofármacos. En sentido estricto, un fitofármaco contiene como “principio activo” una preparación vegetal polivalente en lugar de una sustancia química pura (57). Asimismo, el término “principio activo” no se puede aplicar estrictamente a un fitofármaco, ya que este preparado contiene múltiples principios activos, los cuales pueden contribuir en forma sinérgica y/o aditiva a la expresión de su efecto benéfico (87). Esto ha dificultado el desarrollo de estudios farmacocinéticos y farmacodinámicos, y los estudios clínicos de dichos preparados.

A nivel industrial, la elaboración de un preparado herbal involucra diferentes etapas. Entre ellas podemos mencionar:

1. Recolección del material vegetal. Este se puede obtener de un cultivo orgánico, como de plantas silvestres localizadas en zonas climáticas diferentes, diversidad que puede afectar la proporción de principios activos de la planta.
2. Análisis del material recolectado. Este debe ser analizado respecto de la presencia de contaminantes tales como microorganismos patógenos, insectos, metales pesados, pesticidas, etc. Por lo mismo, el material vegetal es lavado, desinfectado y luego secado, procesos que también deben ser estandarizados.
3. Proceso de extracción. Es fundamental la elección del método de extracción a realizar. De esta elección va a depender el tipo y la cantidad de principios

activos presentes en el extracto final. Así por ejemplo, debemos pensar en el solvente de elección, el tiempo de maceración, la temperatura, el proceso de filtración, etc.

4. Estandarización de las distintas series de preparados. Se prefiere elegir un principio activo relacionado con el efecto terapéutico del preparado o un principio activo abundante en el extracto, para analizar los diferentes lotes de producción y comparar la homogeneidad de los preparados.

Estas etapas son previas a la realización de estudios *in vitro* para caracterizar los preparados herbales de acuerdo a sus propiedades.

Una vez obtenido el preparado herbal, este debe ser caracterizado *in vitro*, proceso que involucra estudios realizados en órganos, cultivos celulares u organelos subcelulares. Estos estudios nos permiten un acercamiento al conocimiento de él o los mecanismos de acción farmacológica del preparado. Luego, se deben realizar estudios *in vivo*, los cuales incluyen: 1) estudios preclínicos conducentes a evaluar la posología, el rango terapéutico y la toxicidad del preparado, y 2) estudios clínicos que involucran ensayos de fase I con un número acotado de adultos jóvenes, fase II con un mayor número de adultos, fase III en pacientes con la enfermedad y por último los de fase IV o post-comercialización que se encargan principalmente de la farmacovigilancia del preparado (78).

Los estudios antes mencionados están perfectamente definidos y normados para los fármacos sintéticos; sin embargo, no existen estudios para fitofármacos (preparados polivalentes). Más aún, existe controversia respecto de algunos estudios realizados con compuestos aislados de plantas medicinales (15).

1.2. ESTUDIOS FARMACOCINÉTICOS

Los estudios de biodisponibilidad de principios activos utilizando mezclas de antioxidantes herbales que aparecen en la literatura, son escasos y presentan varios puntos críticos, entre los cuales es importante mencionar los siguientes:

- Caracterización del preparado herbal. El efecto benéfico de un preparado herbal polivalente o fitofármaco puede ser el resultado de la acción aditiva y/o sinérgica de varios principios presentes en dicho preparado (13, 15, 17, 83). Por lo tanto, los compuestos presentes en el extracto en estudio, como su o sus efectos benéficos son importantes de conocer, ya que ambos se relacionan entre sí. Además la concentración de cada principio activo generalmente es baja, haciendo difícil su cuantificación por métodos HPLC.
- Biodisponibilidad de un preparado polivalente. Los estudios de biodisponibilidad existentes cuantifican un compuesto. Un principio por sí solo no representa al conjunto de principios activos presentes en un fitofármaco, ya que el proceso de absorción y por tanto, la mayor o menor facilidad de llegar al torrente sanguíneo, depende de las características fisicoquímicas propias de cada principio activo. Por lo tanto, el aumento de la

concentración plasmática de dicho compuesto puede o no tener implicancia en la bioactividad de dicho preparado (17, 70, 88).

- Vía de administración. La mayoría de los preparados herbales se expenden como forma farmacéutica de administración oral. Se sabe que muchos fármacos alteran su estructura en el tracto gastrointestinal, por lo que su absorción se ve modificada (15, 17).
- Estudios *in vivo*. La mayoría de los estudios *in vivo* se realizan en animales de laboratorio, como ratones y ratas. Estos estudios nos dan una estimación de lo que podría pasar en el ser humano, pero existen diferencias significativas inter-especie e inter e intra-individuos en cuanto a la absorción, distribución, metabolización y excreción de los principios activos.

La biodisponibilidad de los principios activos herbales, depende de varios factores. Así por ejemplo, la biodisponibilidad de los polifenoles fluctúa entre 15-60% (47, 88). Dependiendo de su peso molecular y de su polaridad, la absorción de estos principios activos se realiza principalmente en el intestino delgado. Las formas no unidas a azúcares (agliconas) de estos compuestos atraviesan por difusión las membranas de los enterocitos. Los principios activos unidos a azúcares deben desglicosilarse por enzimas específicas para poder absorberse. Algunas de estas enzimas están presentes en el intestino y otras están presentes en la flora bacteriana del colon, absorbiéndose una pequeña cantidad en el intestino grueso. Una vez absorbidos los polifenoles se

metabolizan principalmente en el hígado para alcanzar la polaridad suficiente para ser eliminados por la orina (15, 46, 95).

Cabe agregar que preparados herbales provenientes de una misma droga vegetal que difieren en su elaboración y también en su formulación farmacéutica, presentan propiedades físico-químicas diferentes, lo cual implica diferencias en la farmacocinética y la farmacodinamia de los mismos (15, 17).

1.2.1. Puntos críticos en estudios preclínicos

Los estudios preclínicos se realizan generalmente en modelos de observación agudos, en los cuales las determinaciones se efectúan en periodos cortos de tiempo (horas - días). Sin embargo, estos estudios no permiten descartar posibles efectos tóxicos que se pueden presentar a largo plazo. Por lo tanto, deberían además, realizarse estudios de toxicidad en modelos crónicos (15, 17). Existen antecedentes acerca de la capacidad de algunos metabolitos provenientes de polifenoles, los cuales pueden unirse covalentemente a proteínas, lípidos y ADN, alterando las funciones biológicas de estas biomoléculas (15, 17), generando efectos tóxicos a corto y largo plazo. Más aún, muchos de los efectos benéficos que generan los preparados herbales se han demostrado en ensayos *in vitro* (cultivos celulares, tejidos aislados, etc.), existiendo la tendencia a extrapolar estos resultados a lo que sucedería *in vivo* (15, 17).

Las consideraciones antes expuestas resaltan la importancia de normalizar los extractos herbales desde el punto de vista de su elaboración como también respecto de sus efectos farmacológicos. Como una forma de colaborar en este sentido, en este trabajo se propone desarrollar un modelo que permita evaluar la biodisponibilidad de fitofármacos. Ello requiere la elección de algún principio activo cuya concentración sea lo suficientemente alta para que ella pueda ser detectada, cuantificada y separada de otras sustancias por los métodos de cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) establecidos para medir biodisponibilidad. Por otra parte, el principio activo elegido debe desarrollar algún efecto benéfico plasmático, igualmente detectable. Así, como una forma de avanzar en el estudio farmacocinético de fitofármacos, en este trabajo se propuso a los polifenoles como marcadores representativos de la absorción de principios activos. Esta elección se basó en lo siguiente:

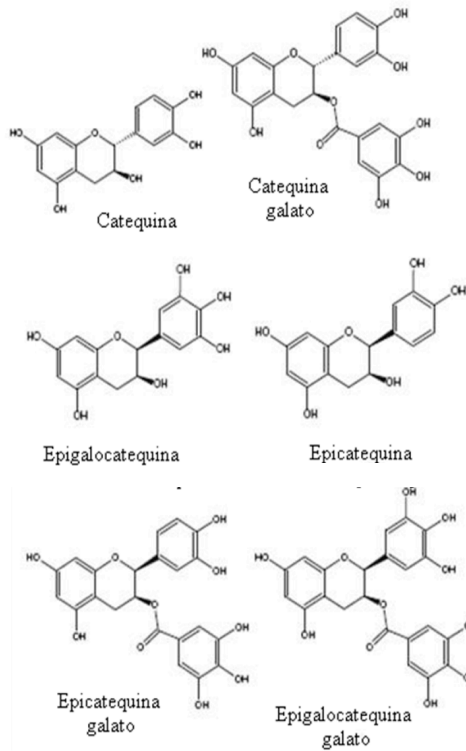
- Los polifenoles son compuestos muy abundantes en todos los preparados herbales, especialmente aquellos obtenidos de las hojas, donde son los mayoritarios.
- Poseen reconocida actividad antioxidante, que puede ser detectada en el plasma sanguíneo. En general todas las patologías, en mayor o menor grado, se asocian a estrés oxidativo. Por lo tanto, los polifenoles que contribuyen a aumentar las defensas antioxidantes del organismo, pueden participar en forma aditiva y/o sinérgica a la cura de las diversas patologías, como también, a mejorar la calidad de vida de los pacientes (64). Es

importante señalar, que mezclas de polifenoles herbales se han utilizado en combinación con fármacos alopáticos en el tratamiento de diferentes patologías asociadas a estrés oxidativo, como son las enfermedades cardiovasculares, el cáncer, la diabetes y las enfermedades neurodegenerativas, entre otras (16, 17).

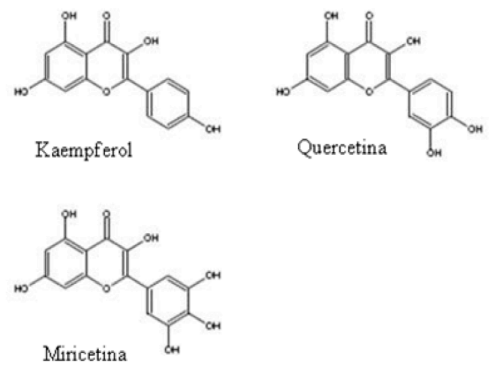
1.3. POLIFENOLES HERBALES

Los polifenoles provenientes de plantas poseen estructuras químicas diversas que tienen en común uno o más grupos fenólicos. Existen muchas formas de clasificarlos; una de ellas los clasifica en flavonoides, ácidos fenólicos y taninos. Los flavonoides constituyen el grupo más grande de los polifenoles presentes en las plantas, y se subdividen en flavanoles, flavonoles, flavanonas, flavonas, isoflavonas y antocianidinas. Asimismo, los ácidos fenólicos se pueden agrupar en ácidos hidroxibenzoicos y ácidos hidroxicinámicos (49). En la Figura 1 se dan ejemplos de los distintos polifenoles mencionados.

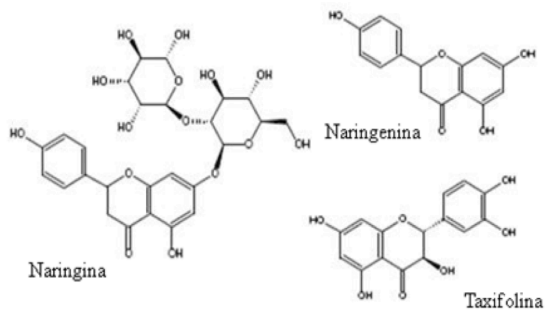
FLAVANOLES



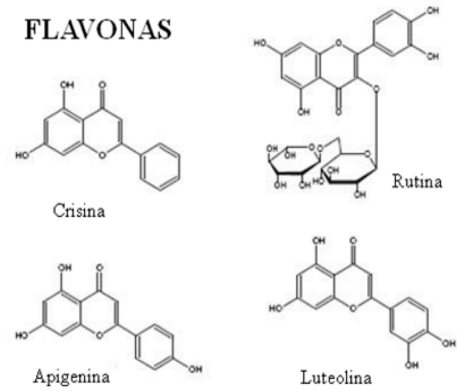
FLAVONOLES



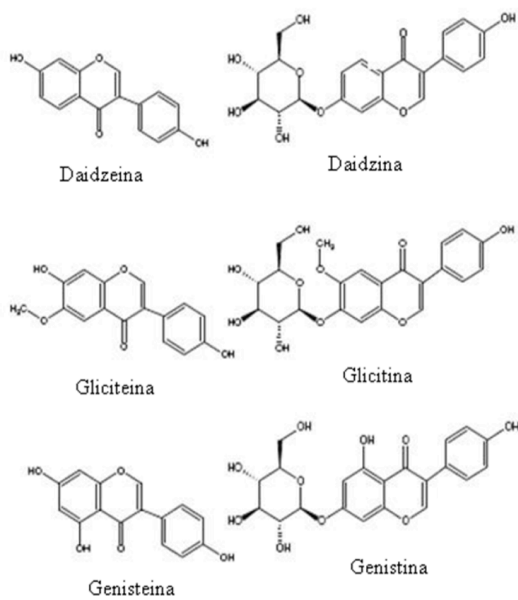
FLAVANONAS



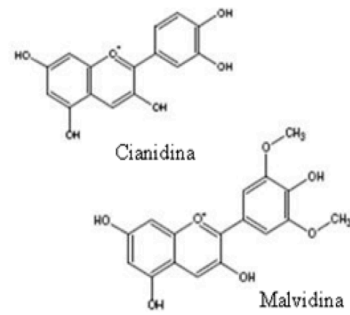
FLAVONAS



ISOFLAVONAS



ANTOCIANIDINAS



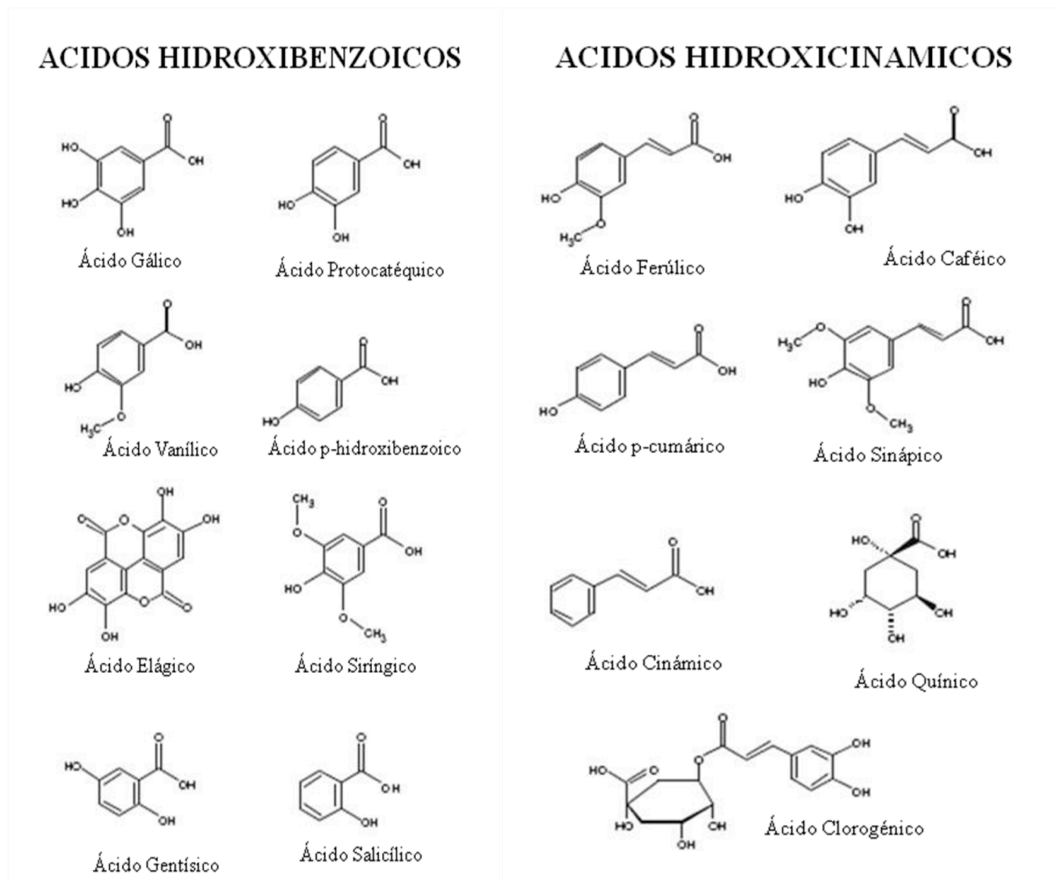


Figura 1. Estructura química de diferentes polifenoles

1.3.1. Polifenoles y sus mecanismos antioxidantes

Los polifenoles aumentan la capacidad antioxidante celular principalmente a través de 3 grandes mecanismos:

- **Atrapan radicales libres.** Los polifenoles poseen un alto potencial redox que les permite ceder electrones. Es por ello que son capaces de transformar a los radicales libres (especies inestables con electrones desapareados) en moléculas estables con enlaces normales (4, 32, 67, 68).
- **Modulan la actividad de diferentes enzimas.** Inducen las principales enzimas involucradas en la reducción de las especies reactivas del oxígeno (EROs) como son: la superóxido dismutasa (SOD), la catalasa, la glutatión peroxidasa y la glutatión reductasa (32, 67). Algunos polifenoles además, inhiben enzimas involucradas en la generación de EROs, como son: xantino-oxidasa y NAD(P)H oxidasas (61).
- **Quelan metales de transición como hierro y cobre.** Los iones de estos metales de transición en su estado reducido, generan EROs a través de las reacciones de Haber-Weiss/Fenton. Por lo tanto, al quelar estos iones, se inhibe la generación de EROs (3, 30, 66).

Los mecanismos antioxidantes antes mencionados, disminuyen la concentración de EROs impidiendo que ellos oxiden compuestos como proteínas, ácidos nucleicos y lípidos. Así, los polifenoles pueden:

- Inhibir la lipoperoxidación, proceso fundamental para mantener la integridad de las membranas biológicas de las células de nuestro organismo (32, 67).
- Reciclar antioxidantes, como por ejemplo α -tocoferol (32).
- Inhibir la oxidación de lipoproteínas de bajo peso molecular o LDL (32, 61, 66).
- Inhibir la formación de trombos al inhibir la agregación plaquetaria, la síntesis de mediadores pro-trombóticos y pro-inflamatorios, la actividad de ciclo-oxigenasas, la producción de eicosanoides y la expresión de moléculas de adhesión (32, 66).
- Proteger al ADN del daño oxidativo (32).
- Inhibir la expresión de genes mutagénicos, lo que se traduce en la inhibición de la expresión de enzimas que estimulan el desarrollo de tumores, como la RNA reductasa, enzima implicada en el inicio, propagación y progresión de la carcinogénesis (32).

La alta concentración de polifenoles en la generalidad de los fitofármacos, como también su capacidad de intervenir en tan diferentes procesos patológicos (todos ellos directamente relacionados con el estrés oxidativo), los convierten en óptimos candidatos como principios evaluables en estudios de biodisponibilidad de fitofármacos (17, 70, 88). Sin embargo, no se puede descartar la presencia de otros antioxidantes como son los compuestos tiólicos, cuyo principal representante por la abundancia de él en los organismos vivos,

es el glutatión (GSH). La principal diferencia de estos compuestos con los polifenoles, es que el producto proveniente de su oxidación es nuevamente reducido por otros compuestos tiólicos como las tiorredoxinas, las glutarredoxinas y el GSH (50, 86). El producto de oxidación de los fenoles en cambio es una quinona, compuesto electrofílico que dependiendo de su lipofilidad, puede ser muy tóxico para el organismo (63).

1.4. ESPECIES VEGETALES

Como fuente de polifenoles, en esta trabajo, se utilizaron extractos hidroalcohólicos de hojas de *Buddleja globosa* Hope y *Plantago major* L.

***Buddleja globosa* Hope.**

Pertenece a la familia de las Buddlejaceae, también es conocido por su nombre común como matico. Su forma silvestre crece en cerros y quebradas entre la región metropolitana y la duodécima región de Chile. Nativo de la región, también se ha descrito esta especie vegetal en Argentina y Perú. Es un arbusto silvestre que puede llegar a medir 3 metros de altura. Las hojas son opuestas, de 15 cm de largo, lanceoladas y de borde almenado; rugosas en la superficie superior y felpudas en el inferior. Las flores están agrupadas en cabezuelas esféricas tubulosas, de color amarillo, aromáticas, de menos de 1 cm de largo (Figura 2). Floreciendo desde noviembre a mayo (24, 55). Con respecto a sus principios activos, el matico presenta varios, destacándose

flavonoides glicosídicos, feniletanoides, iridoides, triterpenoides, sesquiterpenoides. Dentro de los polifenoles podemos nombrar rutina, quercetina, apigenina-7-glucósido y luteolina-7-glucósido (51, 58, 59). En relación con sus efectos terapéuticos, en la literatura existe gran cantidad de documentos que describen el efecto cicatrizante que posee el matico. Así, la infusión de sus hojas es usada en forma tópica para el tratamiento de heridas, quemaduras, inflamaciones, dolor de garganta, tos y úlceras externas e internas, entre otros (4, 25, 52).

Plantago major L.

Pertenece a la familia de las Plantagináceas, también es conocido por su nombre común de llantén mayor. En Chile, es una especie introducida con crecimiento en lugares húmedos a lo largo de todo el país. Es una hierba perenne de tallo grueso, el que apenas sobrepasa el suelo. De este tallo nace una roseta de hojas robustas, con nervadura paralela. La forma de la lámina de las hojas es aovada, terminada en punta. El borde puede ser entero o sinuado. El peciolo es grueso y acanalado. Las flores están agrupadas en una espiga de tallo largo; son pequeñas, de pétalos amarillentos y estambres de filamentos blanquecinos (Figura 2). Los frutos son secos y contienen numerosas semillas negras (11, 24). Con respecto a sus principios activos, podemos mencionar: ácido galacturónico, taninos, alcaloides, esteroides, bases aminadas, compuestos azufrados y varios compuestos polifenólicos. Dentro de los

polifenoles podemos nombrar: apigenina-7-glucósido, baicaleína, luteolina-7-glucósido, plantaginina, escutelarina, entre otros (11, 24, 69). Los efectos terapéuticos se asocian a efectos hepato-protectores y antiinflamatorios (14, 69), en los cuales se utilizan principalmente preparados de sus hojas.

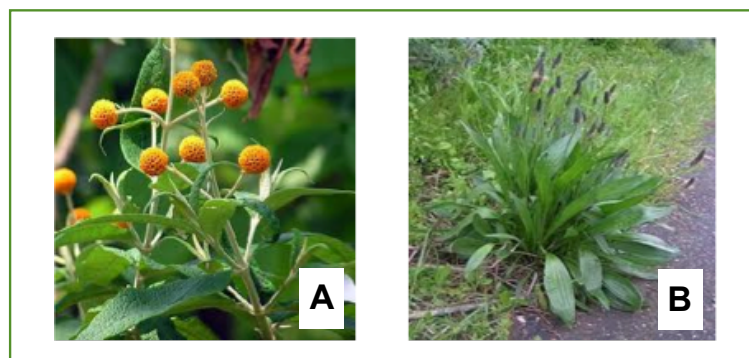


Figura 2. Flores y hojas de *Buddleja globosa* Hope (A) y *Plantago major* L (B)

Estos extractos herbales fueron caracterizados de acuerdo a su concentración de polifenoles y grupos tioles y se determinaron los efectos antioxidantes de ellos sobre lípidos y tioles proteicos. Para evaluar la capacidad antioxidante se utilizó como sistema biológico, microsomas hepáticos de rata, preparación enriquecida en retículo endoplásmico hepático, organelo subcelular donde se encuentran ubicadas mayoritariamente las principales enzimas de biotransformación de xenobióticos: sistema oxidativo del citocromo P450, UDP-glucuroniltransferasa y una isoforma de la GSH-transferasa. Asimismo, como sistema oxidante se utilizó Cu^{2+} /ascorbato, generador de radicales libres del oxígeno a través de las reacciones de Haber-Weiss/Fenton.

Los parámetros farmacocinéticos, generalmente, se correlacionan en forma directa con los efectos farmacológicos de los fármacos sintéticos. Estos parámetros son obtenidos a partir de las curvas concentración *versus* tiempo. Como se mencionó anteriormente, existe dificultad para cuantificar un principio activo presente en un fitofármaco por los métodos HPLC clásicos. Por lo tanto, los parámetros cinéticos podrían obtenerse de curvas que relacionen algún efecto farmacológico plasmático a través del tiempo. Es por ello que en este trabajo se intentó determinar la concentración plasmática de compuestos polifenólicos presentes en los extractos en estudio y además, determinar el efecto antioxidante plasmático de ellos a través del tiempo.

Para el desarrollo de los estudios de biodisponibilidad se implementó una técnica HPLC utilizando para ello los siguientes estándares de polifenoles: catequina, rutina, quercetina, baicaleína, apigenina-7-glucósido y luteolina-7-glucósido. A continuación, muestras de plasma de ratas Sprague-Dawley tratadas vía oral con diferentes dosis de los preparados herbales en estudio, fueron analizadas por el método HPLC para cuantificar los estándares antes mencionados. Paralelamente, se cuantificó la capacidad antioxidante plasmática de dichas muestras. Los resultados obtenidos se discuten al final de este manuscrito, desde el punto de vista farmacocinético y su posible aplicación al desarrollo de fitofármacos seguros y eficaces.

2. HIPÓTESIS

*“Los preparados de *Buddleja globosa* Hope (matico) y *Plantago major* L. (llantén) presentan diferente concentración de polifenoles totales y diferente actividad antilipoperoxidante y protectora de tioles proteicos. Asimismo, la administración oral de estos preparados a ratas Sprague-Dawley, provocan un aumento temporal de la capacidad antioxidante plasmática.”*

3. OBJETIVOS

3.1. OBJETIVO GENERAL

Correlacionar la capacidad antioxidante plasmática con la concentración de polifenoles totales después de la administración oral a ratas Sprague-Dawley de un extracto estandarizado de *Buddleja globosa* Hope (matico) y otro de *Plantago major* L. (llantén).

3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- 3.2.1. Determinar la concentración de polifenoles y tioles totales de los extractos herbales.
- 3.2.2. Evaluar la capacidad antioxidante *in vitro* de los extractos herbales determinando su capacidad de:
 - 3.2.2.1. Inhibir la oxidación de los lípidos y tioles microsómicos.
 - 3.2.2.2. Quelar iones Cu^{2+} .
 - 3.2.2.3. Inhibir la actividad GSH-transferásica microsómica.
- 3.2.3. Implementar un método HPLC, para determinar el perfil de los compuestos fenólicos presentes en los extractos herbales.
- 3.2.4. Determinar por el método HPLC la concentración de polifenoles plasmáticos en ratas tratadas con diferentes dosis orales de los extractos herbales.

- 3.2.5. Evaluar la capacidad reductora de hierro y la concentración de malondialdehído en el plasma de ratas tratadas con diferentes dosis orales de los extractos herbales.

4. MATERIALES Y MÉTODOS

4.1. MATERIALES

4.1.1. Reactivos

Solución amortiguadora de pH Tris-HCl, GSH, reactivo de Ellman: ácido 5,5-dithiobis-(2-nitrobenzoico) (DTNB), albumina bovina (Fracción IV), ditioneitol (DTT), N-acetil-cisteína (NAC), cisteína, catequina, rutina, quercetina y baicaleína adquiridos en Sigma Aldrich Chemical Co. (St. Louis, MO, USA). Ácido tricloroacético (ATC), ácido tiobarbitúrico (ATB), ascorbato de sodio, CuSO₄, MgCl₂, FeSO₄, tripiridil-s-triazina (TPTZ), malondialdehído (MDA), H₃PO₄, NaOH, tertbutil hidroxitolueno, etanol, metanol, acetonitrilo, acetato de etilo, dietileter, acetona, HCl, ácido acético y reactivo de Folin-Ciocalteu adquiridos de Merck S.A., Chile. 1-chloro-2,4-dinitrobenzeno (DNB) adquirido en ACROS Organics (New Jersey, NJ, USA). Luteolin-7-glucósido adquirido en Phytolab y apigenina-7-glucósido adquirido en Fluka. El resto de los reactivos utilizados fueron de calidad p.a.

Los extractos hidro-alcohólicos (50:50 = etanol: agua) de matico y llantén fueron donados por Laboratorios Ximena Polanco®.

4.1.2. Obtención de la droga vegetal

Las hojas de matico y llantén provenientes de cultivos orgánicos, fueron recolectadas en el mes de Noviembre (previo a su floración) (81, 82). La droga vegetal obtenida fue revisada por el Departamento de Control de Calidad de Laboratorios Ximena Polanco, luego se realizó el proceso de elaboración de los extractos que es información confidencial y propiedad de la empresa. Sin embargo, se nos aportó la información del proceso de preparación y caracterización de los extractos de hojas de matico y llantén que son los que se muestran a continuación. Se adjuntan los certificados de análisis de los extractos de matico y llantén entregados por la empresa en Anexo 1.

Las hojas de matico y llantén fueron lavadas y sometidas a un proceso de secado en equipos especializados hasta obtener un máximo de 10% de humedad. Las condiciones de tiempo y temperatura están definidas y normadas en el laboratorio según la especie vegetal. Tras el secado se procedió a la obtención del tamaño de partículas apropiado para la extracción de los principios activos, a través de la utilización de equipos procesadores especiales. Antes de iniciar el proceso de extracción, se determinaron las características botánicas para confirmar la especie vegetal y las características químicas que determinan la presencia de flavonoides, taninos y saponinas. Luego, se inició el proceso de extracción utilizando como solvente etanol/agua. Las variables como proporción de etanol, temperatura, agitación y/o tiempo de maceración

que necesita cada preparado para su óptima extracción, están estandarizadas para cada especie vegetal, de acuerdo a parámetros internos de la empresa. Finalizado el tiempo de maceración, los preparados se filtraron para obtener los extractos hidro-alcohólicos finales.

Los extractos así obtenidos se caracterizaron de acuerdo a sus propiedades organolépticas, físico-químicas e identificación química de algunos componentes. Los procedimientos a través de los cuales se llevan a cabo estos procesos son realizados bajo normativas de la Farmacopea Chilena (10), Documento 32 OMS (89), Métodos de Control de Calidad para Materiales de Plantas Medicinales, OMS (90) y Guía para la Industria, Productos de Fármacos Botánicos, FDA (76). Los resultados de estos análisis se encuentran en el certificado de calidad entregado por la empresa (Anexo 1).

4.1.2.1. Propiedades organolépticas:

- a) Aspecto:** En un tubo de ensayo se colocaron 5 mL de muestra y se observó la transparencia; no debe existir partículas extrañas en suspensión.
- b) Color:** En un tubo de ensayo se colocaron 5 mL de muestra y se observó el color.
- c) Olor:** En un tubo de ensayo se colocaron 5 mL de muestra y se percibió el olor.

4.1.2.2. Propiedades físico-químicas:

- a) pH:** se determinó en un pH-metro a 20 °C.
- b) Grado alcohólico:** se determinó a 20 °C mediante un alcoholímetro cuya graduación fluctúa entre 0 ° – 100 °GL.
- c) Residuo sólido:** un volumen medido de extracto se colocó en una cápsula de porcelana previamente tarada. Luego se evaporó el solvente en un horno a 100 °C hasta peso constante. Por diferencia de pesada se obtuvo el peso del residuo sólido de acuerdo a la siguiente fórmula:

$$\frac{Pf - Pcv}{Pcm - Pcv} \times 100 = \text{Residuo sólido \%}$$

Donde: Pf: Peso final

Pcv: Peso cápsula vacía

Pcm: Peso cápsula + muestra

4.1.2.3. Identificación química:

- a) Flavonoides:** sea determinó mediante la técnica de Schivata. La reacción positiva produce una coloración que varía de amarillo, anaranjado, rosado a rojo, rojo a crinson, crinson a magenta, algunas veces coloración azul o verde. La muestra a analizar se mezcló con HCl concentrado y granallas de Magnesio (Mg^o); el hidrógeno liberado en la reacción entre este ácido y el

magnesio metálico, reduce al flavonoide. La ecuación química que representa esta reacción se muestra en la Figura 3.

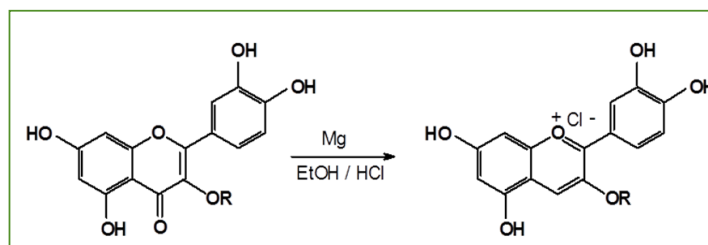


Figura 3. Reacción de Schivata

b) Taninos: Estos compuestos se reconocieron mediante la prueba del FeCl₃. La reacción positiva se debe a la formación de un complejo coloreado, cuyo color va del verde al azul dependiendo de la clase de taninos (azul= taninos gálicos; verde= taninos catéticos). En este caso el ión férrico forma un complejo coloreado con los -OH fenólicos, como se muestra en la Figura 4.

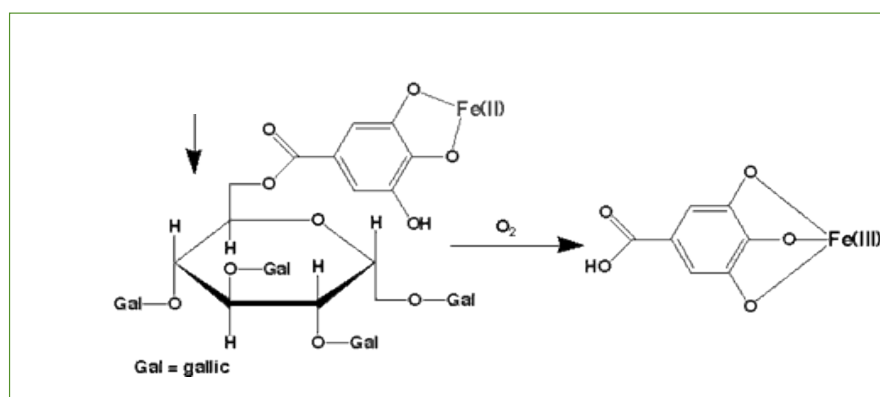


Figura 4. Reacción de taninos con cloruro férrico

c) **Saponinas:** La presencia de saponinas se determinó mediante:

- La prueba de la espuma. La muestra se agitó vigorosamente hasta la aparición de espuma persistente por una hora o más.
- Cromatografía en capa fina (CCF) (84). Se utilizaron placas de sílica-gel y como solvente de elusión, cloroformo-metanol-agua (60:40:4). Una vez corrido el cromatograma, la placa se secó y luego se reveló con anisaldehído sulfúrico. Al examinar el cromatograma a la luz visible, aparece una banda café claro, que indica la presencia de saponinas. El anisaldehído se condensa con las saponinas y este derivado es el responsable del color observado. En la Figura 5 se puede observar la estructura química de los compuestos mencionados. El anisaldehído se preparó mezclando 0,5 mL de anisaldehído con 10 mL de ácido acético glacial; luego se agregó 85 mL de metanol y 5 mL de H₂SO₄ concentrado.

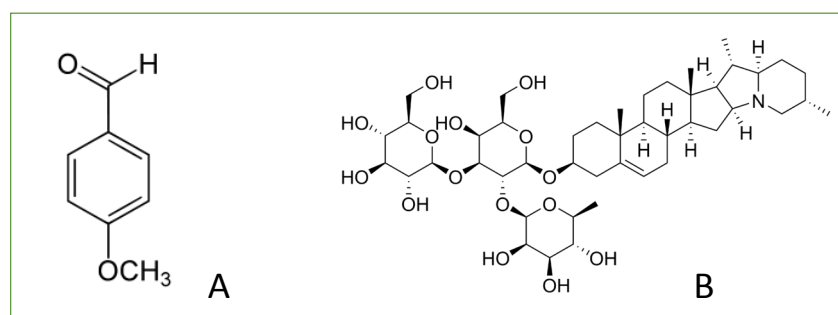


Figura 5. Estructura química de (A) anisaldehído y (B) saponina

1.1. MÉTODOS

4.2.1. Animales de experimentación

Para los estudios realizados *in vitro* e *in vivo* se utilizaron ratas machos de 3 meses de edad y un peso promedio de 300 g de la cepa Sprague-Dawley. Los animales fueron mantenidos con una dieta normal (pellet Kimber), agua *ad libitum*, ciclos de luz y oscuridad, y a una temperatura ambiente de 21 °C. Estos animales se obtuvieron del Bioterio de la Facultad de Medicina de la Universidad de Chile. Todos los procedimientos fueron aprobados por el Comité de Bioética (Protocolo CBA #0486 FMUCH, Anexo 2).

4.2.2. Preparación de microsomas hepáticos

Los microsomas hepáticos de rata (preparación experimental enriquecida en retículo endoplásmico) fueron utilizados como sistema biológico para medir la capacidad antioxidante de los extractos de matico y llantén (35).

La obtención de los microsomas se realizó a partir de ratas Sprague-Dawley las cuales se mantuvieron en ayunas durante 15 h previas al sacrificio, con agua *ad libitum*. Al cabo de este período, los animales se sacrificaron de acuerdo a los métodos aceptados por la “Asociación Médico Veterinaria de América” (www.ivis.org) y la “Asociación Chilena de Ciencias de Animales de Laboratorio (ASOCHICAL)”, el que contempla la utilización de una guillotina especial para realizar la decapitación de los animales, procurando una muerte rápida, con

mínimo sufrimiento. Los hígados se perfundieron *in situ* con 0,9 % P/V NaCl, se removieron por incisión, y luego se mantuvieron en hielo. Luego se limpiaron de tejido conectivo y vasos sanguíneos, se seccionaron en trozos pequeños y se homogenizaron 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 250 rpm. El homogeneizado así preparado se centrifugó a 9.000 g por 15 min y el *pellet* se descartó. El sobrenadante obtenido se centrifugó a 105.000 g por 60 min. El *pellet* obtenido de esta centrifugación corresponde a la fracción microsómica, la que se almacenó a -80 °C en un freezer IShin modelo DS8514 por no más de 3 meses para su uso posterior. Todos los procedimientos de homogeneización y fraccionamiento se realizaron a 4 °C. La cuantificación de la proteína microsómica se determinó por el método espectrofotométrico de Lowry y cols. (1951) (44), utilizando albúmina sérica de bovino (fracción IV) como estándar. Los resultados se expresaron en mg de proteína microsómica/mL.

4.2.3. Cuantificación de polifenoles totales

La concentración de polifenoles presentes en los preparados de matico y llantén se determinó a través del método de Folin-Ciocalteu descrito en Letelier y cols., (2009) (42).

En un volumen final de 2 mL la mezcla de reacción contenía: 20 µL del extracto herbal diluido adecuadamente, 100 µL de reactivo Folin-Ciocalteu, 300 µL de carbonato de sodio 20 % P/V y agua destilada suficiente para completar 2 mL.

El blanco contenía todos los reactivos con excepción de los extractos herbales. Todas las mezclas así obtenidas se incubaron a oscuridad durante 2 h. Al finalizar este periodo la absorbancia de las muestras se registró a 760 nm usando los blancos respectivos como referencia. La linealidad del método se analizó realizando una curva de calibración utilizando catequina como estándar: catequina [(+) – cianidol – 3 - (2R, 3S) - 2-(4,4-dihidroxifenil) - 3,4-dihidro - 1(2H) – benzopiran - 3,5,7-triol - (+) - trans-3,3',4',5,7 - pentahidroxi flavona)]. Los resultados se expresaron en μ moles equivalentes de catequina/mL de extracto, en g equivalentes de catequina/100 g de droga vegetal, en mmoles equivalentes de catequina/g de extracto seco y en mg equivalentes de catequina/g de extracto seco \pm su desviación estándar (DE).

4.2.4. Cuantificación de tioles totales

La concentración de tioles presentes en los preparados de matico y llantén se cuantificó a través de la reacción de Ellman, que mide la aparición equimolar de ácido 5-tio-2-nitrobenzoico (ATNB) (coeficiente de extinción $13.600 \text{ M}^{-1} \times \text{cm}^{-1}$) (37). En la Figura 6 se observa la reacción del ácido 5,5'-ditiobis-(2-nitrobenzoico) (DTNB) con enlaces SH-, que produce ATNB. Como estándar de referencia se utilizó GSH.

La mezcla de reacción contenían en un volumen final de 1 mL: concentraciones adecuadas del extracto herbal, 50 μ L de DTNB 2 mM disuelto en acetato de sodio 50 mM (reactivo preparado al momento de usar), 100 μ L de solución

amortiguadora de pH TRIS 1 M pH 8 y agua destilada suficiente para completar 1 mL. Los blancos contenían todos los reactivos excepto el DTNB. Las mezclas de reacción se incubaron durante 10 min y luego se determinó la absorbancia de las muestras contra sus blancos a 412 nm. La linealidad del método se analizó realizando una curva de calibración utilizando glutatión como estándar. Los resultados se expresaron en μ moles equivalentes de glutatión/mL de extracto, en g equivalentes de glutatión/100 g de droga vegetal, en mmoles equivalentes de glutatión/g de extracto seco y en mg equivalentes de glutatión/g de extracto seco \pm su desviación estándar (DE).

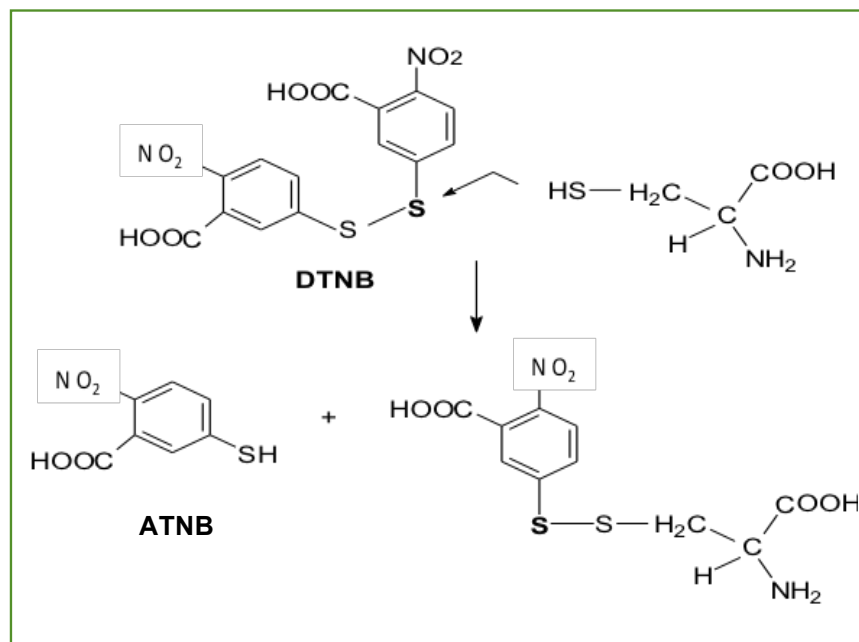


Figura 6. Reacción de Ellman

4.2.5. Condiciones oxidativas experimentales

Se utilizó como sistema oxidante una mezcla de sulfato de cobre 25 η M y ascorbato de sodio 1 mM. Este sistema (Cu^{2+} /ascorbato), a través de las reacciones de Haber-Weiss/Fenton, genera EROs, principales especies oxidantes celulares (37).

4.2.6. Lipoperoxidación microsómica

Se estimó midiendo las sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico por el método descrito en Letelier y cols., (2005) (37), utilizando Cu^{2+} /ascorbato como fuente generadora de EROs. El malondialdehído generado como producto de descomposición de los lipoperóxidos formados, reacciona con el ácido tiobarbitúrico dando lugar a un conjugado, el cual posee una absorbancia máxima a 532 η m y su coeficiente de extinción es $156.000 \text{ M}^{-1} \times \text{cm}^{-1}$. En la Figura 7 se observa la reacción del ácido tiobarbitúrico con el malondialdehído. La mezcla de reacción contenía en un volumen final de 1 mL: concentraciones adecuadas del extracto herbal, solución amortiguadora de pH fosfato de potasio 50 mM pH 7,4 y proteína microsómica 0,2 mg/mL. Las mezclas se incubaron durante 10 min a 37 °C en un baño termorregulado con agitación constante. Luego se adicionó CuSO_4 25 η m más ascorbato de sodio 1 mM y se incubaron durante 20 min a 37 °C. Al cabo de este período se adicionó a los blancos y las muestras 0,25 mL de ATC al 20 % frío (4 °C). Para eliminar las proteínas precipitadas se centrifugaron las muestras a 9.000 g durante 10 min en una

centrifuga refrigerada (4°C). Alícuotas de 0,5 mL de los sobrenadantes se mezclaron con 0,5 mL de ATB al 1 % y se incubaron durante 60 min a 50 °C para desarrollar la reacción colorimétrica. Al cabo de este período, se leyó la absorbancia de las muestras a 532 nm contra los blancos respectivos en un espectrofotómetro acoplado a un computador. Los blancos contenían todos los reactivos, excepto la proteína microsómica. Los resultados se expresaron en µL de extracto/mg proteína microsómica, en µg equivalentes de catequina/mg proteína microsómica y en µg de extracto seco/mg proteína microsómica que fueron capaces de inhibir el 50% de la oxidación de lípidos microsómicos ± su desviación estándar (DE).

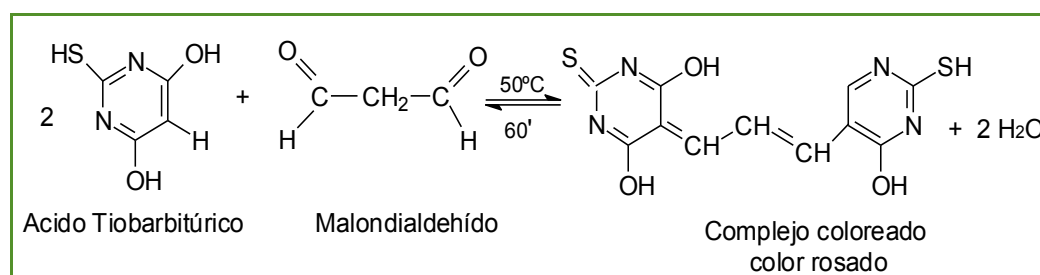


Figura 7. Reacción del ácido tiobarbitúrico

4.2.7. Oxidación de tioles microsómicos

La medición de los tioles totales se realizó espectrofotométricamente cuantificando el ATNB liberado en la reacción entre el DTNB y los grupos sulfhidrilos presentes en la muestra (37). Este compuesto absorbe a 412 nm y su coeficiente de extinción es 13.600 M⁻¹ x cm⁻¹. La mezcla de reacción

contenía en un volumen final de 1 mL: concentraciones variables del extracto herbal, solución amortiguadora de pH TRIS 1 M pH 8, proteína microsómica 0,1 mg/mL y agua destilada suficiente para completar 1 mL. Las mezclas así preparadas se incubaron durante 10 min a 25 °C. Luego, se adicionó CuSO_4 25 μM y ascorbato de sodio 1 mM y se incubaron durante 30 min a 25 °C. Al cabo de este período se adicionó a los blancos y las muestras, DTNB 2 mM disuelto en acetato de sodio 50 mM (reactivo preparado al momento de usar) y se incubaron durante 10 min a 25 °C antes de determinar la absorbancia de las muestras contra sus blancos a 412 nm. Los blancos contenían todos los reactivos excepto la proteína microsómica. Los resultados se expresaron en μL de extracto/mg proteína microsómica, μg equivalentes de GSH/mg proteína microsómica y en μg de extracto seco/mg proteína microsómica que fueron capaces de inhibir el 50% de la oxidación de tioles microsómicos \pm su desviación estándar (DE).

4.2.8. Isobologramas

Los isobologramas son representaciones gráficas en un eje de coordenadas de dosis equi-efectivas de dos o más fármacos (74, 77). Para obtener los datos necesarios para la construcción de los isobologramas utilizamos el extracto de matico y el de llantén (60, 74, 77, 85). Se estudiaron los efectos antioxidantes de la mezcla de ambos extractos herbales sobre la oxidación de los lípidos y tioles microsómicos. Las mezclas en estudio estaban constituidas por una

concentración fija, el IC₂₅, de uno de los extractos y concentraciones menores al IC₅₀ del otro extracto. En estas condiciones se obtuvo el IC₅₀ de la mezcla de los extractos herbales en estudio.

4.2.9. Quelación de Cu²⁺

Para estudiar esta propiedad de los extractos herbales, se determinó la modificación del espectro de una solución de CuSO₄ 0,5 mM entre 200 y 600 nm, en ausencia y presencia de los extractos herbales en estudio en un espectrofotómetro UV-VIS modelo UV3 acoplado a un computador. El espectro del CuSO₄ 0,5 mM se realizó utilizando como referencia, solución amortiguadora de pH 50 mM; pH 7,4. La referencia en el caso de las mezclas CuSO₄/extracto fue una alícuota del extracto en ensayo (10 µL) diluida en solución amortiguadora de pH fosfato de potasio 50 mM; pH 7,4.

4.2.10. Actividad GSH-transferásica microsómica

Esta actividad se determinó por el método descrito en Letelier y cols., (2006) (38). La conversión del sustrato 1-cloro-2,4-dinitrobenzeno (DNB) en conjugado de GSH, produce un cambio en las propiedades espectrales de este sustrato que se aprovecha para cuantificar la reacción (Figura 8). El conjugado formado posee una absorbancia máxima 340 nm y su coeficiente de extinción es 9.600 M⁻¹ x cm⁻¹.

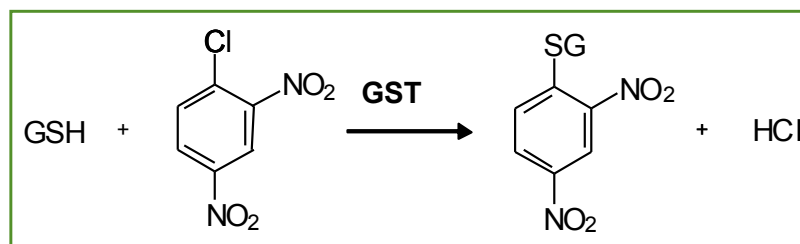


Figura 8. Reacción enzimática entre GSH y DNB catalizada por la GSH-transferasa (GST)

La mezcla de reacción contenía en un volumen final de 1 mL: concentraciones variables del extracto herbal, proteína microsómica 0,1 mg/mL, GSH 4 mM, solución amortiguadora de pH fosfato de potasio 0,1 M pH 6,5 y DNB 1 mM. Se utilizó como blanco un sistema que contenía todos los componentes de la mezcla de reacción, excepto GSH. La reacción se inició agregando el GSH a las muestras. La velocidad de reacción se determinó, midiendo en forma continua a 20 °C, el aumento de absorbancia a 340 nm en un espectrofotómetro UNICAM VIS modelo 3, termorregulado y acoplado a un computador. Los resultados se expresaron en μ moles equivalentes de -SH/0,1 mg de proteína microsómica que fueron capaces de inhibir el 50% de la actividad GSH-transferásica (GST) \pm su desviación estándar (DE). Estos valores para los extractos de matico y llantén fueron obtenidos al titular los tioles (Tabla 1), considerando como estándar GSH que posee un grupo tiol (-SH) por mol. Para DTT, NAC y cisteína, la cantidad de tioles se obtuvo de sus respectivas curvas de calibración (datos no mostrados).

4.2.11. Tratamiento oral de los animales con los extractos de matico y llantén

Los animales fueron distribuidos en grupos de 3 animales cada uno. Los extractos de matico y de llantén fueron administrados vía oral a los animales, mediante gavage (administración de medicamentos a un animal a través de un tubo que va de la garganta al estómago).

Las dosis administradas fueron:

GRUPO	DOSIS	
	mg equivalentes de catequina/Kg peso vivo	mg de extracto seco/Kg peso vivo
Matico A (Dosis 1X)	0,546	2,0
Matico B (Dosis 10X)	5,46	20,0
Llantén A (Dosis 1X)	0,546	4,6
Llantén B (Dosis 5X)	2,73	23,0

A estos grupos se les adicionó el grupo control que recibió sólo agua, 300 µL, volumen equivalente al de los extractos administrados. El grupo llantén B recibió la dosis 5X y no 10X como fue el caso del matico, debido a que el volumen calculado para contener 5,46 mg equivalentes de catequina sobrepasó la capacidad estomacal de la rata (12). Los cálculos de las dosis de extracto mencionadas para las ratas se realizaron considerando los volúmenes de fitofármacos líquidos aconsejados como dosis diarias por la empresa: 1,5 mL/día para humanos (70 Kg) y la diferencia metabólica de la rata, que corresponde a un metabolismo 4 veces mayor que la del humano (33).

Este tratamiento se realizó en el Bioterio periférico del Centro de Investigaciones Farmacológicas y Toxicológicas de la Facultad de Medicina División Occidente de la Universidad de Chile. Todos los procedimientos fueron aprobados por el Comité de Bioética de la Facultad de Medicina de la Universidad de Chile (Protocolo CBA #0486 FMUCH, Anexo 2).

La Figura 9 muestra un cuadro resumen de los tratamientos, como también de los tiempos testeados. El número de animales por grupo (3) fue calculado considerando el tamaño muestral de casos y controles (45).

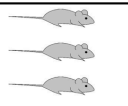
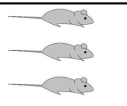

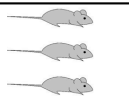
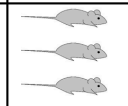



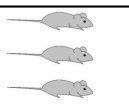
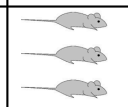
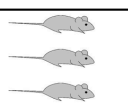



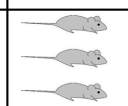
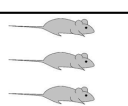
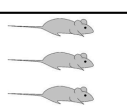
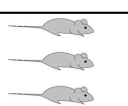
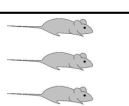
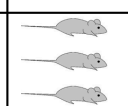
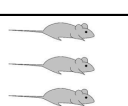
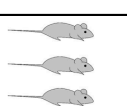
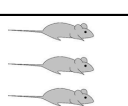
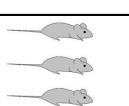
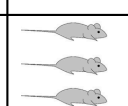
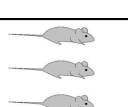
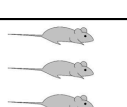
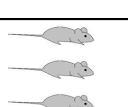
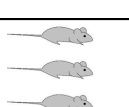
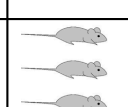
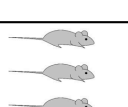
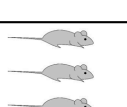
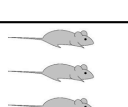
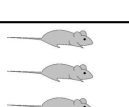
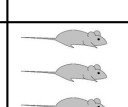
GRUPO		Control	Matico A	Matico B	Llantén A	Llantén B
Tiempo de extracción de sangre (horas)	0					
	2					
	4					
	6					
	8					
	10					
	12					

Figura 9. Protocolo de tratamiento de los animales. Las condiciones del tratamiento con los extractos herbales se encuentran descritas en Métodos.

4.2.12. Estudios Toxicológicos

Los estudios preclínicos en animales, nos permiten determinar la eficacia y seguridad de los compuestos en estudio. Para determinar la seguridad, es necesario hacer estudios toxicológicos que nos den información de los efectos

secundarios que pueden producirse en un ser vivo. Así, se determinó la toxicidad aguda tras la administración de las dosis de los extractos a ratas Sprague-Dawley. El objetivo fue obtener datos sobre los efectos producidos en el animal después de una única exposición del fitofármaco. Para esto se observaron a los animales después de la administración del extracto herbal desde el tiempo 0 a 12 h post-administración según los siguientes parámetros:

- Aspecto: si el pelaje presenta un aspecto normal, en mal estado, con secreciones oculares y/o nasales o si presenta una postura anormal.
- Comportamiento espontáneo: si es normal, si presenta pequeños cambios, inactividad, automutilación, vocalización anormal y/o hiperactividad.
- Comportamiento en respuesta a la manipulación: si es normal, si presenta pequeños cambios, cambios moderados, agresividad o animal comatoso.
- Constantes vitales: si es normal, si hay cambios notorios en la temperatura corporal, frecuencia cardíaca o respiratoria.
- Mortalidad.

Las ratas se mantuvieron en jaulas identificadas para cada grupo y se observaron los parámetros señalados previamente. En la Figura 10 se observa cómo se identificaron las jaulas en los diferentes grupos en estudio.










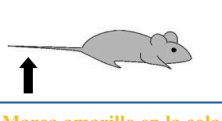
Grupo Control	<p>Jaula: color azul</p> 	<p>Ratas: cola marca azul</p> 
Grupo Matico A	<p>Jaula: color rojo</p> 	<p>Ratas: cola marca rojo</p> 
Grupo Matico B	<p>Jaula: color naranja</p> 	<p>Ratas: cola marca naranja</p> 
Grupo Llantén A	<p>Jaula: color verde</p> 	<p>Ratas: cola marca verde</p> 
Grupo Llantén B	<p>Jaula: color amarillo</p> 	<p>Ratas: cola marca amarillo</p> 

Figura 10. Modo de Identificación de las jaulas de los animales bajo tratamiento

4.2.13. Obtención de las muestras de plasma

Las muestras de sangre de las ratas fueron obtenidas por punción cardiaca a los tiempos 0-2-4-6-8-10-12 h post-administración de los tratamientos (Figura 9). Para ello, los animales se anestesiaron previamente con una mezcla de

Ketamina con Xilacina (dosis: Ketamina 50 mg/Kg + Xilacina 15 mg/Kg) (20). Las muestras de sangre fueron recibidas en tubos con EDTA (8) y luego centrifugadas a 3000 rpm por 20 min en una centrífuga Jouan GR412 refrigerada a 4 °C. Los sobrenadantes correspondientes a las muestras de plasma se guardaron a -20 °C hasta su procesamiento.

Posteriormente los animales se sacrificaron por decapitación en el Bioterio periférico del Centro de Investigaciones Farmacológicas y Toxicológicas (IFT), de la Facultad de Medicina, División Occidente de la Universidad de Chile, tal como lo señala el protocolo de bioética.

4.2.14. Capacidad plasmática reductora de hierro (FRAP)

Esta metodología se realizó de acuerdo a la técnica descrita por Benzie y Strain (1996) (9). Esta técnica mide la capacidad del plasma de reducir Fe^{3+} a Fe^{2+} el cual, a un pH bajo, forma un complejo coloreado Fe^{2+} con la 2,4,6-tripiridil-s-triazina (TPTZ). Este complejo absorbe a 593 nm. Los valores obtenidos se comparan con una solución acuosa que contiene iones ferrosos de concentración conocida. Los valores de absorbancia son lineales en un amplio rango de concentraciones con mezclas de antioxidantes, incluyendo el plasma y soluciones que contienen un antioxidante purificado.

Para llevar a cabo estas determinaciones, se preparó el reactivo FRAP mezclando 10 volúmenes de solución amortiguadora de pH acetato 300 mmol/L, a pH 3,6; con 1 volumen de TPTZ 10 mmol/L en HCl 40 mM y con 1

volumen de FeCl_3 20 mM. A continuación, 3 mL del reactivo FRAP se calentaron a 37 °C y se leyó su absorbancia a 593 nm contra agua. Posteriormente, se añadieron 100 µL de la muestra y 300 µL de agua desionizada al reactivo FRAP, y se leyó la absorbancia durante 8 min a una longitud de onda de 593 nm en un espectrofotómetro. La muestra se incubó a 37 °C durante todo el período de seguimiento. El reactivo blanco se resta de la capacidad de absorción final y el resultado se comparó con la curva estándar preparada utilizando distintas concentraciones en el intervalo de 100-1000 mM de FeSO_4 . La linealidad de la relación entre la concentración de Fe^{2+} y la capacidad de absorción es muy buena dentro de este rango de concentración ($r=0,9899$), según lo descrito por Rodrigo y cols., 2005 (65). Los resultados se expresaron en µM/L de plasma ± su desviación estándar (DE).

4.2.15. Determinación de malondialdehído plasmático (MDA)

Además de determinar la capacidad reductora de hierro plasmático, y como una forma de corroborar la capacidad antioxidante plasmática, se determinó la concentración de malondialdehído (MDA) a través de un método HPLC con detector de fluorescencia. En este caso la reacción de formación de malondialdehído se detiene adicionando a la muestra de plasma 20 µL/mL de terbutil-hidroxitolueno (BHT 10 mM) hasta su procesamiento y cuantificación. La cuantificación de MDA fue desarrollado a través de una detección fluorimétrica descrita por Young y Trimble, 1991 (96).

La reacción con el ácido tiobarbitúrico se produce al mezclar 250 μL de ácido fosfórico 1,22 M con 450 μL de agua grado HPLC, 50 μL de la muestra y 250 μL de ácido tiobarbitúrico 0,44 M. Esta mezcla se incubó por 1 h a 100 °C y después se dejó enfriar en hielo. A continuación a 200 μL de la mezcla, se adicionaron 360 μL de metanol grado HPLC más 40 μL de NaOH 1 M. Las condiciones cromatográficas fueron: Fase Móvil=solución amortiguadora de pH fosfato 25 mM pH 6,5:Metanol (50:50, % V/V); flujo=0,8 mL/min; Detección excitación=532 nm y emisión=553 nm. Los resultados se expresaron como μM de MDA/L de plasma \pm su desviación estándar (DE).

4.2.16. Análisis estadístico

Las pruebas de significado estadístico de los resultados obtenidos en este trabajo, se realizaron mediante la prueba t de Student, utilizando para ello el programa computacional GraphPad Prism 5,0. Los coeficientes de regresión lineal (r) y la prueba de carencia de ajuste (F) se realizaron utilizando el programa computacional Excel 2011. Para los ensayos *in vivo*, se utilizó la prueba de Mann-Whitney no pareado. Las diferencias fueron consideradas estadísticamente significativas cuando el valor de p fue $\leq 0,05$.

5. RESULTADOS

5.1. CONCENTRACIÓN DE POLIFENOLES Y TIOLES TOTALES DE LOS EXTRACTOS HERBALES DE MATICO Y LLANTÉN

En todas las etapas de procesamiento realizadas, los extractos hidroalcohólicos de matico y llantén se prepararon bajo las mismas condiciones. Por lo tanto, la única diferencia entre ambos extractos es la especie vegetal utilizada. Se adjunta certificado de análisis de los extractos entregados por la empresa privada (Anexo 1).

La Tabla 1 muestra el contenido total de polifenoles y tioles de los extractos de matico y llantén. Los resultados fueron expresados como: μ moles equivalentes de estándar/mL de extracto; g equivalentes de estándar/100 g droga vegetal, mmoles equivalentes de estándar/g de extracto seco y mg equivalentes de estándar/g de extracto seco. Los estándares utilizados para las determinaciones de polifenoles y tioles fueron catequina y GSH, respectivamente. Independiente de la forma de expresión de los resultados, las concentraciones de polifenoles como también de tioles del extracto de matico fueron aproximadamente 3 veces superiores a las del extracto de llantén. Así, las concentraciones de polifenoles totales expresados como μ moles equivalentes de catequina/mL del extracto de matico y llantén fueron

21,8 ± 1,15 y 7,6 ± 1,48; respectivamente. Por otra parte, las concentraciones de tioles totales expresados como μmoles equivalentes de GSH/mL de extracto para los extractos de matico y llantén fueron $0,71 \pm 0,09$ y $0,27 \pm 0,05$; respectivamente. Interesantemente, para ambos extractos se observó que la concentración de polifenoles era significativamente mayor a la de tioles, alcanzando un valor aproximado de 30 veces.

Tabla 1. Caracterización de los extractos herbales en estudio

	Matico	Llantén
Contenido Total de Polifenoles		
[μmoles equivalentes de catequina/mL de extracto]	21,80 ± 1,15 *	7,63 ± 1,48
[g equivalentes de catequina/100 g droga vegetal]	6,33 ± 0,33 *	2,21 ± 0,43
[mmoles equivalentes de catequina/g de extracto seco]	0,96 ± 0,05 *	0,41 ± 0,08
[mg equivalentes de catequina/g de extracto seco]	278,67 ± 14,51 *	119,01 ± 23,22
Contenido Total de grupos Tioles		
[μmoles equivalentes de glutatión/mL de extracto]	0,71 ± 0,09 *	0,27 ± 0,05
[g equivalentes de glutatión/100 g droga vegetal]	0,218 ± 0,028 *	0,083 ± 0,015
[mmoles equivalentes de glutatión/g de extracto seco]	0,03 ± 0,004 *	0,02 ± 0,003
[mg equivalentes de glutatión/g de extracto seco]	9,53 ± 1,20 *	4,50 ± 0,83

Droga vegetal: 1 g de droga vegetal rinde 10 mL de extracto, para ambas especies vegetales. Extracto seco: 1 mL de los extractos de matico y llantén rinden 22,7 y 18,4 mg de extracto seco, respectivamente. Cada valor representa el promedio de al menos 4 experimentos independientes ± DE. El significado estadístico de los resultados se analizó a través del test de Student comparando el extracto de matico con respecto al extracto de llantén a igualdad de expresión de unidades de concentración; (*): diferencia estadísticamente significativa, $p < 0,05$. La cuantificación de polifenoles y tioles totales se realizó de acuerdo a lo descrito en la sección Métodos.

5.2. CAPACIDAD ANTIOXIDANTE *IN VITRO* DE LOS EXTRACTOS HERBALES DE MATICO Y LLANTÉN

5.2.1. Inhibición de la oxidación de lípidos y tioles microsómicos

Ambos extractos fueron capaces de prevenir la oxidación de los lípidos y los tioles microsómicos inducida por el sistema Cu^{2+} /ascorbato. La Figura 11 muestra las curvas semi-logarítmicas concentración-respuesta que expresan el efecto de los extractos de matico (Figura 11A) y llantén (Figura 11B) sobre la lipoperoxidación microsómica inducida por el sistema Cu^{2+} /ascorbato. Asimismo, la Figura 12 muestra las curvas semi-logarítmicas concentración-respuesta que expresan el efecto de los extractos de matico (Figura 12A) y llantén (Figura 12B) sobre la oxidación de los tioles microsómicos inducida por el sistema Cu^{2+} /ascorbato. A partir de estas curvas se obtuvieron los valores de IC_{50} , los cuales representan la concentración de extracto que inhibe el 50% de la lipoperoxidación y la oxidación de los tioles microsómicos, ambas reacciones inducidas por Cu^{2+} /ascorbato (Tabla 2).

El efecto antilipoperoxidante del matico indicado por su valor de IC_{50} expresado en volumen de extracto agregado/mg de proteína microsómica, fue aproximadamente 3 veces menor al de llantén: IC_{50} matico= 0,39 μL vs IC_{50} llantén= 1,25 $\mu\text{L}/\text{mg}$ proteína microsómica (Tabla 2).

El efecto protector sobre los tioles microsómicos provocado por los extractos fue similar al obtenido en la lipoperoxidación microsómica. Así, los valores de IC_{50} mostraron que el volumen agregado del extracto de matico/mg de proteína microsómica para prevenir en un 50% la oxidación de los tioles microsómicos inducida por Cu^{2+} /ascorbato, fue 3 veces menor que el volumen de llantén: IC_{50} matico= 0,86 μ L vs IC_{50} llantén= 2,80 μ L/mg proteína microsómica (Tabla 2).

Sin embargo, cuando los microsomas fueron incubados con igual concentración de polifenoles totales (μ g equivalentes de catequina/mg de proteína microsómica), los valores de IC_{50} fueron similares. Así, para la prevención de la lipoperoxidación microsómica los IC_{50} fueron 2,47 y 2,77 μ g equivalentes de catequina/mg de proteína microsómica para matico y llantén, respectivamente. Asimismo, los valores de IC_{50} para la prevención de la oxidación de los tioles microsómicos fueron 0,19 y 0,23 μ g equivalentes de GSH/mg de proteína microsómica para matico y llantén, respectivamente. Esto indicaría que las actividades antioxidantes medidas, dependerían preferentemente del contenido de polifenoles y tioles totales presentes en ambos extractos.

Es relevante mencionar que en los sistemas biológicos, los compuestos tiólicos son los principales agentes antioxidantes celulares no enzimáticos.

Ellos ejercen su actividad antioxidante a través de mecanismos similares a los polifenoles; por ejemplo, son capaces de atrapar radicales libres del oxígeno y de quelar metales. Sin embargo, los tioles presentan diferencias, ya que una vez oxidados, pueden ser re-reducidos por otros compuestos tiólicos como por ejemplo el GSH y por tanto, pueden ser reutilizados (93, 94).

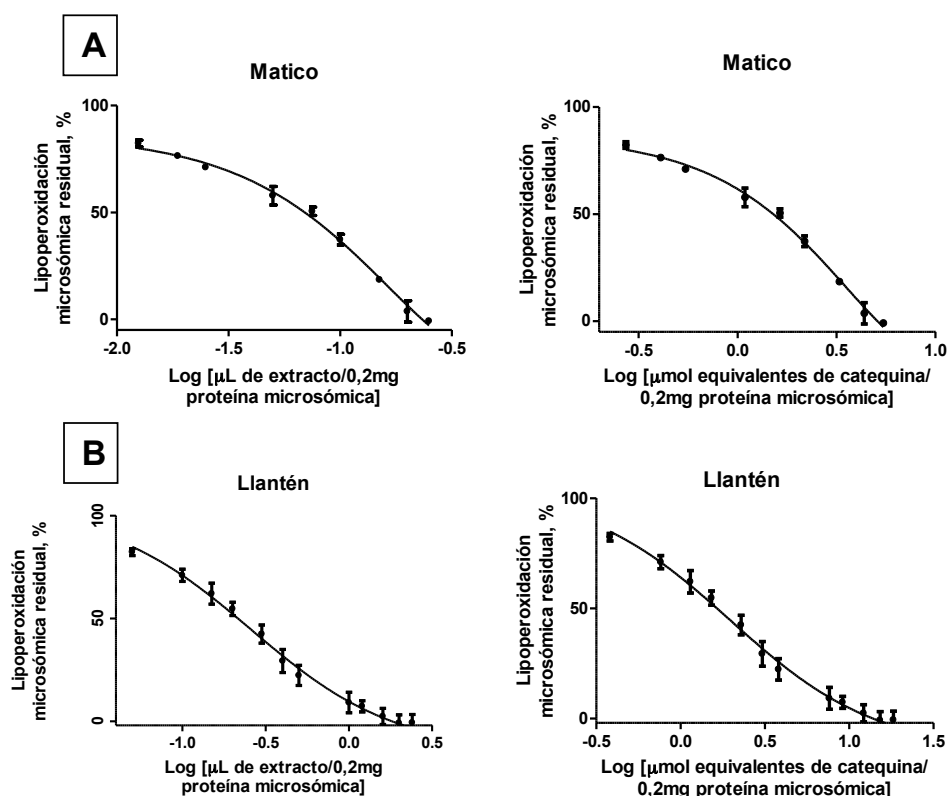


Figura 11. Efecto de los extractos de matico (A) y llantén (B) sobre la lipoperoxidación microsómica inducida por Cu^{2+} /ascorbato. Los microsomas (0,2 mg de proteína/mL) se incubaron con cada uno de los extractos durante 10 min y luego con CuSO_4 25 μM y ascorbato de sodio 1 mM durante 20 min a 37 °C con agitación constante antes de medir la lipoperoxidación de acuerdo a lo descrito en la sección Métodos. El rango de concentraciones de extracto utilizadas fue 0,22 – 5,45 nmoles equivalentes de catequina (0,01 – 0,25 μL del extracto) para el extracto de matico y 0,38 – 15,2 nmoles equivalentes de catequina (0,05 – 2,00 μL del extracto) para el extracto de llantén/0,2 mg proteína microsómica. Los valores representan el % de lipoperoxidación residual, considerando como 100% la lipoperoxidación medida en presencia de CuSO_4 /ascorbato y ausencia de los extractos. Los valores de IC_{50} fueron extrapolados de las curvas semi-logarítmicas (IC_{50} = 1,8 y 4,6 μg de extracto seco/0,2 mg proteína microsómica para matico y llantén respectivamente). Cada valor graficado representa el promedio de al menos 4 experimentos independientes \pm DE.

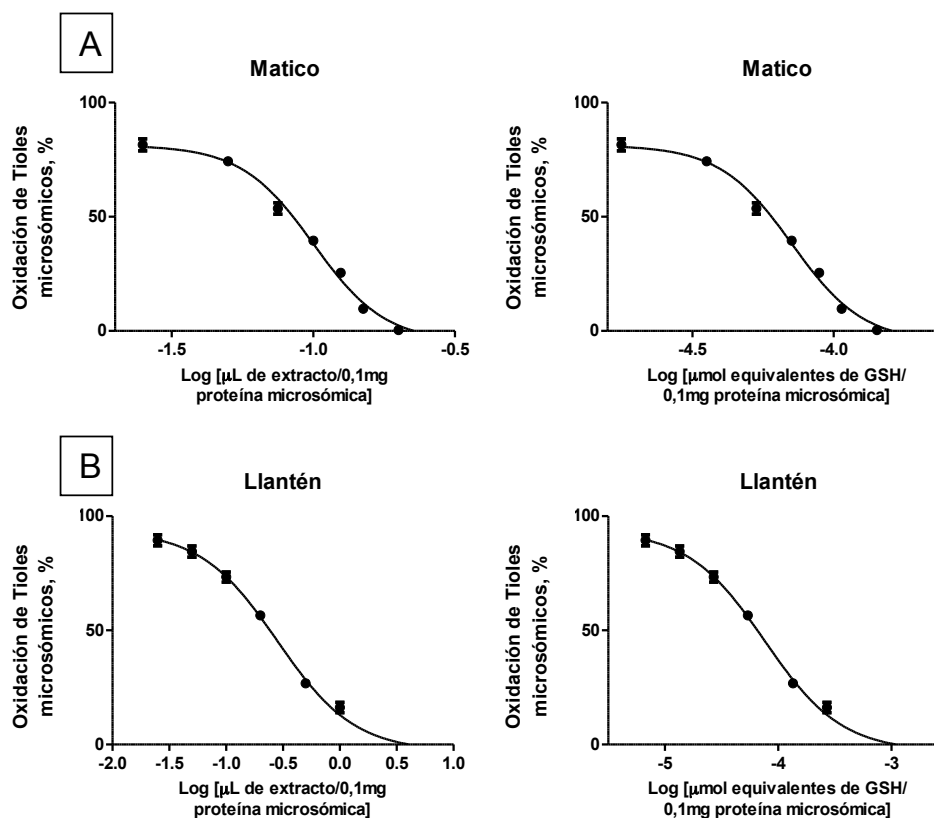


Figura 12. Efecto de los extractos de matico (A) y llantén (B) sobre la prevención de la oxidación del contenido de tioles microsómicos inducido por Cu^{2+} /ascorbato. Los microsomas (0,1 mg de proteína/mL) se incubaron durante 10 min con cada uno de los extractos y luego 30 min con CuSO_4 25 μM y ascorbato de sodio 1 mM a 25 °C con agitación constante antes de medir el contenido total de tioles de acuerdo a lo descrito en la sección Métodos. El rango de concentraciones de extracto utilizadas fue 0,018 – 0,284 nmoles equivalentes de GSH (0,025 – 0,40 μL del extracto) para el extracto de matico y 0,007 – 1,08 nmoles equivalentes de GSH (0,025 – 4,00 μL del extracto) para el extracto de llantén/0,1 mg proteína microsómica. Los valores representan el % de disminución de los tioles microsómicos, considerando como 100% la oxidación de los tioles microsómicos en presencia de CuSO_4 /ascorbato y ausencia de los extractos. Los valores de IC_{50} fueron extrapolados de las curvas semi-logarítmicas (IC_{50} = 1,95 y 5,15 μg de extracto seco/0,1 mg proteína microsómica para matico y llantén respectivamente). Cada valor graficado representa el promedio de al menos 4 experimentos independientes \pm DE.

Tabla 2. Caracterización de la capacidad antioxidante *in vitro* de los extractos herbales de matico y llantén

IC ₅₀	Matico	Llantén	Relación Matico/Llantén
Inhibición de la lipoperoxidación microsómica			
[µL de extracto/ mg proteína microsómica]	0,39 ± 0,02 *	1,25 ± 0,04	0,31
[µg equivalentes de catequina/ mg proteína microsómica]	2,47 ± 0,12	2,77 ± 0,11	0,89
[µg de extracto seco/ mg proteína microsómica]	8,85 ± 0,36 *	23,0 ± 1,15	0,38
Inhibición de la oxidación de tioles microsómicos			
[µL de extracto/ mg proteína microsómica]	0,86 ± 0,03 *	2,80 ± 0,17	0,31
[µg equivalentes de GSH/ mg proteína microsómica]	0,19 ± 0,01	0,23 ± 0,02	0,83
[µg de extracto seco/ mg proteína microsómica]	19,5 ± 0,98 *	51,5 ± 1,80	0,38

Droga vegetal: 1 g de droga vegetal rinde 10 mL de extracto, para ambas especies vegetales. Extracto seco: 1 mL de los extractos de matico y llantén rinden 22,7 y 18,4 mg de extracto seco, respectivamente. Los valores de IC₅₀ fueron obtenidos de las curvas semi-logarítmicas concentración-respuesta respectivas (Figura 11 y 12). El significado estadístico de los resultados se analizó a través del test de Student comparando el extracto de matico con respecto al extracto de llantén a igualdad de expresión de unidades de concentración; (*): diferencia estadísticamente significativa, p<0.05.

5.2.2. Reversión de la oxidación de los tioles microsómicos

En la célula animal existen diferentes circuitos tiólicos que se regulan a través de reacciones redox. Estas reacciones involucran tanto la oxidación de tioles proteicos, como también la reducción de los enlaces disulfuros formados por la oxidación de los grupos tiólicos. A nivel celular sin embargo, la oxidación de los polifenoles a quinonas no puede ser revertida. Como una forma de evaluar la capacidad de los extractos herbales no sólo de prevenir la oxidación de los tioles (Figura 12 y Tabla 2), sino además de revertirla, se adicionaron los extractos herbales a los microsomas previamente tratados con el sistema oxidante. Los resultados de estos experimentos mostraron que ambos extractos eran capaces de revertir la oxidación de los tioles microsómicos. Más aún, el valor del IC_{50} para matico fue 50 μ L y para llantén 140 μ L de extracto/mg proteína microsómica, comprobando una vez más que el efecto antioxidante del extracto de matico es aproximadamente 3 veces mayor al del extracto de llantén (Figura 13 y Tabla 3).

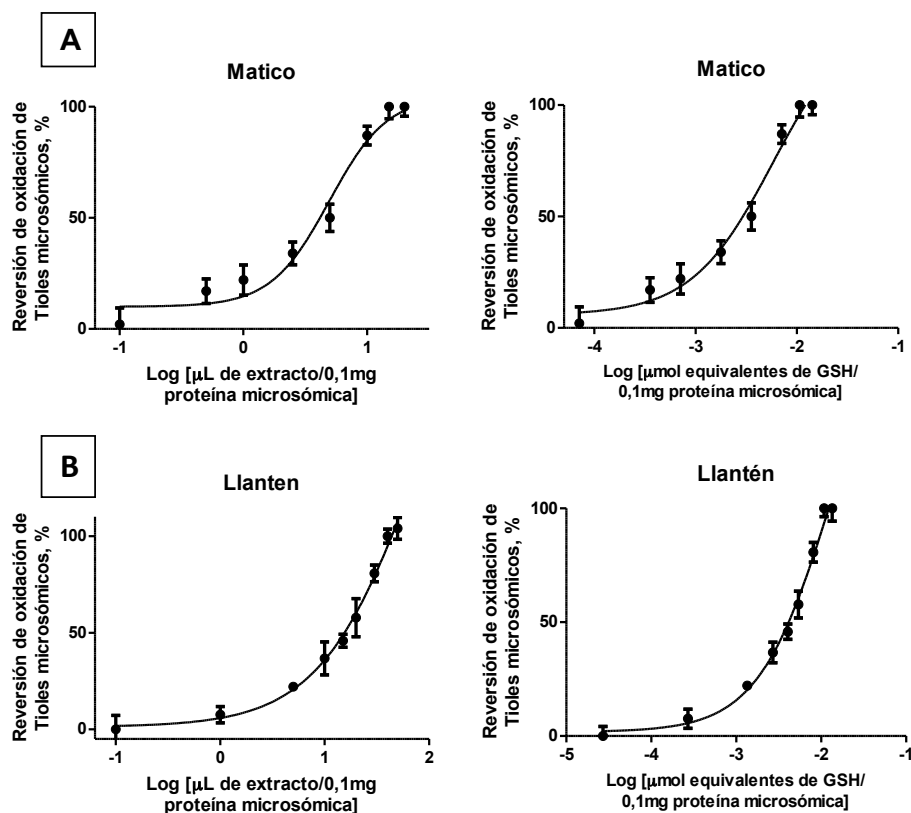


Figura 13. Efecto de los extractos de matico (A) y llantén (B) sobre la reversión de la oxidación del contenido de tioles microsómicos inducido por Cu^{2+} /ascorbato. Los microsomas (0,1 mg de proteína/mL) se incubaron con CuSO_4 25 μM y ascorbato de sodio 1 mM durante 30 min a 25 °C con agitación constante. Luego se adicionaron los extractos de matico o llantén y se incubaron durante 10 min antes de medir los tioles microsómicos de acuerdo a lo descrito en la sección Métodos. El rango de concentraciones de extracto utilizadas fue 0,07 – 14,20 nmoles equivalentes de GSH (0,1 – 20 μL del extracto) para el extracto de matico y 0,03 – 13,50 nmoles equivalentes de GSH (0,1 – 50 μL del extracto) para el extracto de llantén/0,1 mg proteína microsómica. Los valores representan el % de aumento de los tioles microsómicos. Se consideró como 0% de reversión de la oxidación de tioles microsómicos medido en presencia del sistema oxidativo y ausencia de los extractos. Los valores de IC_{50} fueron extrapolados de las curvas semi-logarítmicas (IC_{50} = 113,5 y 257,6 μg de extracto seco/0,1 mg proteína microsómica para matico y llantén respectivamente). Cada valor graficado representa el promedio de al menos 4 experimentos independientes \pm DE.

Tabla 3. Capacidad de los extractos de matico y llantén de revertir la oxidación de tioles microsómicos

IC₅₀	Matico	Llantén	Relación Matico/Llantén
[μ L de extracto/mg proteína microsómica]	50 \pm 2,50 *	140 \pm 4,20	0,36
[μ g equivalentes de GSH/mg proteína microsómica]	10,91 \pm 0,44	11,62 \pm 0,52	0,94
[μ g de extracto seco/mg proteína microsómica]	1135 \pm 45,40 *	2576 \pm 77,30	0,44

Droga vegetal: 1 g de droga vegetal rinde 10 mL de extracto, para ambas especies vegetales. Extracto seco: 1 mL de los extractos de matico y llantén rinden 22,7 y 18,4 mg de extracto seco, respectivamente. Los valores de IC₅₀ fueron obtenidos de las curvas semi-logarítmicas concentración-respuesta respectivas (Figura 13). Cada valor representa el promedio de al menos 4 experimentos independientes \pm DE. El significado estadístico de los resultados se analizó a través del test de Student comparando ambos extractos a igualdad de expresión de unidades de concentración (*): diferencia estadísticamente significativa, p<0.05.

5.2.3. Isobologramas

Los preparados de hojas de matico como de llantén presentan al menos dos tipos de compuestos antioxidantes: polifenoles y tioles (Tabla 1). Aunque estos compuestos comparten mecanismos de acción antioxidante, presentan diferencias. Así por ejemplo, a nivel celular, la oxidación de los tioles a disulfuros es revertida ya sea por GSH como por proteínas tiólicas como las tioredoxinas (28, 54, 86); sin embargo, la oxidación de los polifenoles a quinonas no puede ser revertida. Por otra parte, los preparados de matico se utilizan comúnmente como antiinflamatorios y cicatrizantes de uso local; los preparados de hojas de llantén en cambio, se utilizan comúnmente como hepatoprotectores (14, 69). Estos antecedentes indicarían que las propiedades físico-químicas de los antioxidantes presentes en las hojas de ambas especies son diferentes, por lo tanto sus propiedades antioxidantes podrían ocurrir a través de mecanismos diferentes. Si el proceso se produce a través de mecanismos diferentes, el efecto antioxidante final en presencia de ambos preparados antioxidantes, se obtendría con menores concentraciones de ellos al comparar su utilización en forma aislada, fenómeno conocido como sinergia (77, 83, 87).

Al utilizar ambos extractos en mezcla para inhibir la lipoperoxidación y graficar los valores obtenidos a través de isobologramas, se observó que los efectos antioxidantes procedían a través de mecanismos aditivos (Figura 14). Dado que

el sistema biológico utilizado en esta tesis es una preparación enriquecida en retículo endoplásmico hepático de rata, este mecanismo podría estar representado, al menos en parte, por la capacidad de los polifenoles presentes en ambos extractos de atrapar radicales libres; sin embargo, se requieren mayores experimentos para corroborar este postulado.

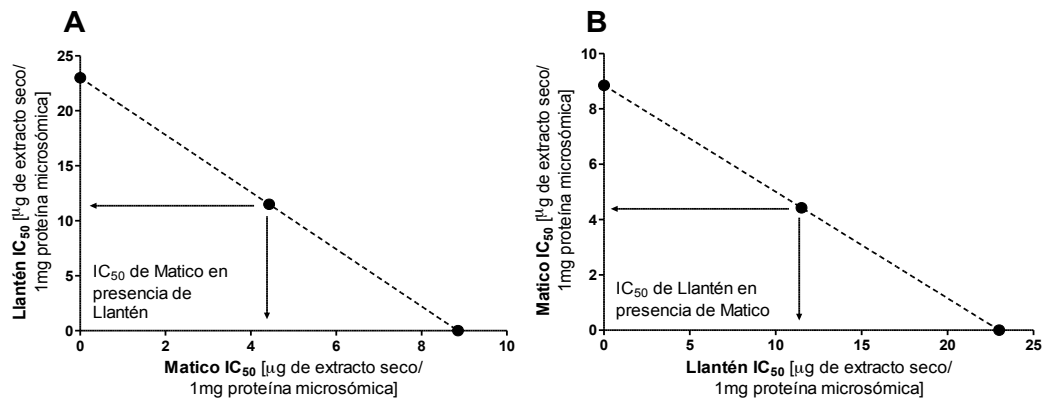


Figura 14. Isoblograma de la inhibición de la lipoperoxidación microsómica en presencia de los extractos de matico y llantén. Para determinar los IC₅₀ de los extractos herbales en mezcla se utilizaron los IC₂₅ de los extractos de matico o llantén obtenidos de las curvas semi-logarítmicas (0,195 y 0,625 μ L de extracto/mg proteína microsómica, lo que equivale a 4,425 y 11,500 μ g de extracto seco/mg de proteína microsómica respectivamente) y se variaron las concentraciones del extracto a evaluar. El gráfico A muestra el IC₅₀ del extracto de matico en mezcla con llantén y el gráfico B, el IC₅₀ del llantén en mezcla con el extracto de matico. La determinación de la lipoperoxidación se realizó de acuerdo a lo descrito en la sección Métodos. Cada valor graficado representa el promedio de al menos 4 experimentos independientes.

Por otra parte, los isobogramas obtenidos al determinar el efecto antioxidante de ambos extractos sobre la protección de los tioles microsómicos de la oxidación inducida por el sistema Cu^{2+} /ascorbato, evidenciaron que este fenómeno procedía a través de mecanismos sinérgicos, indicando que más de un mecanismo estaría involucrado en dicho efecto protector (Figura 15). Más aún, el IC_{50} del extracto de matico en presencia de llantén (concentración igual al IC_{25}) y el extracto de llantén en presencia de matico, disminuyeron aproximadamente 4 veces para la prevención de la oxidación de los tioles microsómicos.

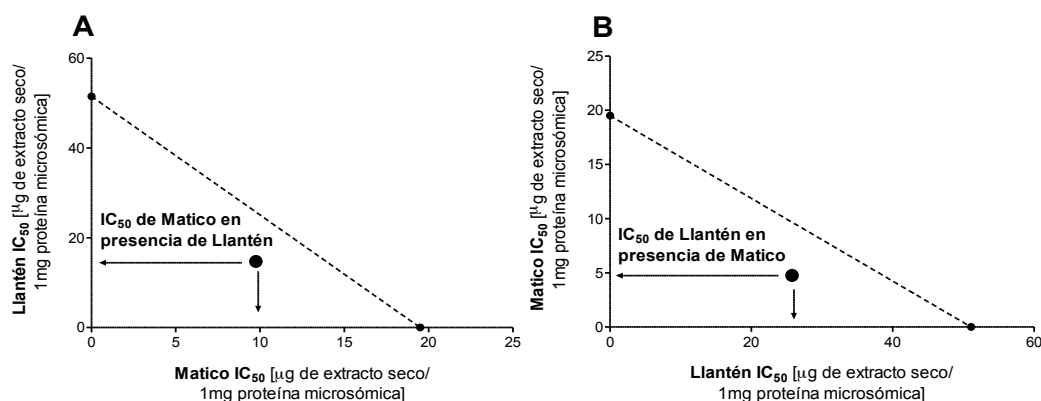


Figura 15. Isobogramas de la protección de tioles microsómicos de la oxidación en presencia de los extractos de matico y llantén. Para determinar los IC_{50} de los extractos herbales en mezcla se utilizaron los IC_{25} de los extractos de matico o llantén obtenidos de las curvas semi-logarítmicas (0,43 y 1,40 μL de extracto/mg proteína microsómica, lo que equivale a 9,75 y 25,75 μg de extracto seco/mg proteína microsómica, respectivamente) y se variaron las concentraciones del extracto a evaluar. El gráfico A muestra el IC_{50} del extracto de matico en mezcla con llantén y el gráfico B, el IC_{50} del llantén en mezcla con el extracto de matico. La determinación de tioles totales se realizó de acuerdo a lo descrito en la sección Métodos. Cada valor graficado representa el promedio de al menos 4 experimentos independientes.

5.2.4. Efecto antioxidante comparativo de catequina y GSH

Micromoles de estos compuestos/mg de proteína microsómica fueron necesarios para obtener efectos similares a los de los extractos hidroalcohólicos de matico y llantén, de los cuales se utilizaron sólo η moles equivalentes/mg de proteína microsómica para prevenir la lipoperoxidación y la oxidación de los tioles microsómicos (Tabla 4).

Tabla 4. Oxidación de lípidos y tioles microsómicos inducida por Cu^{2+} /ascorbato en presencia de GSH y catequina

Condiciones	Catequina % de inhibición	GSH % de inhibición
Prevención oxidación de lípidos microsómicos	100 \pm 4,6	75 \pm 3,3
Prevención oxidación de tioles microsómicos	42 \pm 1,5	67 \pm 3,9

La proteína microsómica (1 mg) fue incubado a 37 °C con 1 μ mol de GSH o catequina antes de incubar dicha mezcla con el sistema Cu^{2+} /ascorbato. Los valores en % se calcularon considerando como 100% de oxidación el valor obtenido en presencia del sistema oxidante y ausencia de catequina y GSH. Los valores representan el promedio de al menos 4 experimentos independientes \pm DE.

5.2.5. Quelación de iones Cu^{2+}

Otro mecanismo que desencadena la generación celular de especies reactivas al oxígeno (EROs) es el mediado por iones de metales de transición, tales como hierro y cobre. A través de las reacciones de Haber-Weis/Fenton, estos metales, en su estado iónico reducido pueden generar EROs provocando estrés oxidativo. Por lo tanto, la quelación de iones metálicos libres es otro mecanismo que puede contribuir a disminuir la concentración de EROs celular. Este mecanismo parece tener especial importancia en las enfermedades neurodegenerativas como Alzheimer y Parkinson, las cuales se han asociado a estrés oxidativo y a un aumento de hierro y cobre en las neuronas del hipocampo y la sustancia nigra (5).

Para evaluar esta propiedad, se analizaron los cambios espectrales de cobre (II) inducidas por ambos extractos herbales (Figura 16). Ambos extractos cambiaron el espectro de cobre (II) mostrando la formación de un complejo entre moléculas del extracto y el cobre, lo que confirma la capacidad de los extractos herbales de quelar metales de transición (19).

Es importante destacar que los extractos en estudio y GSH no fueron capaces de reducir al Cu^{2+} , lo cual fue determinado midiendo la capacidad de este ión, en presencia de los extractos en estudio, de inducir estrés oxidativo en microsomas hepáticos de rata (datos no mostrados).

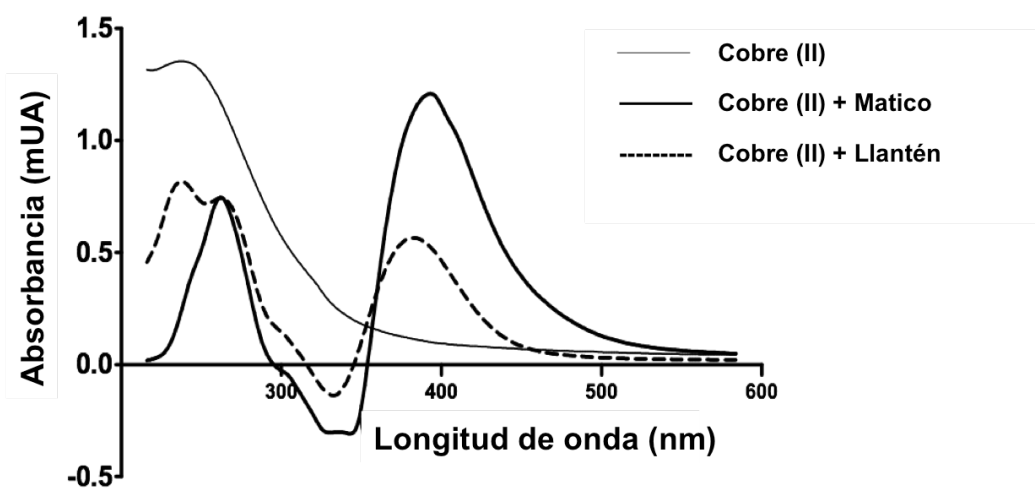


Figura 16. Quelación de Cu^{2+} en presencia de los extractos de matico y llantén. La quelación de Cu^{2+} se realizó mezclando CuSO_4 con 218,0 y 76,3 nmoles equivalentes de catequina para el extracto de matico y llantén, respectivamente (los cuales corresponden a 0,227 y 0,184 mg extracto seco respectivamente). El gráfico corresponde a los resultados experimentales entregados por el espectrofotómetro.

5.2.6. Inhibición de la actividad GSH-transferásica microsómica

GSH-transferasa (GST) es una enzima ampliamente distribuida en el cuerpo. Esta enzima cataliza la conjugación de compuestos electrófilos con GSH, evitando así el daño que podrían causar a biomoléculas. Su forma activa catalítica corresponde a un dímero disulfuro -SS- (1). Su forma latente e inactiva en la membrana es su monómero -SH. Como una forma de probar la capacidad de los extractos herbales de reducir el dímero -SS-, se determinó la capacidad de inhibición de la actividad GST microsómica (Tabla 5).

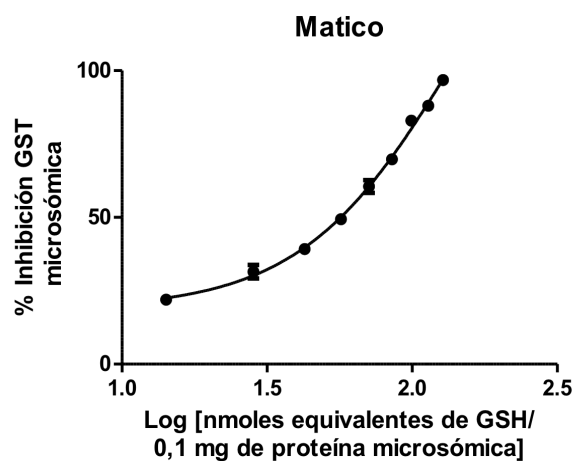
Ambos extractos inhibieron la actividad GST microsómica de forma similar. Los valores de IC_{50} para los extractos de matico y llantén fueron 0,01325 y 0,01361 μ moles equivalentes de GSH/0,1 mg de proteína microsómica, respectivamente (Figuras 17 y 18). Resultados similares se obtuvieron en nuestro laboratorio con otros extractos de hierbas (34, 38, 39, 41). Sin embargo, los agentes reductores sintéticos: ditioneitol (DTT), N-acetil-cisteína (NAC) y cisteína en las mismas condiciones experimentales, presentaron valores de IC_{50} aproximadamente 100 veces mayores: DTT = 1,510 μ moles, NAC = 2,120 μ moles y cisteína = 1,550 μ moles equivalentes de GSH/0,1 mg de proteína microsómica (Tabla 5 y Figuras 19, 20 y 21).

Tabla 5. IC₅₀ para la inhibición de la actividad GST microsómica inducida por el extracto de matico y llantén, ditioneitol, N-acetil-cisteína y cisteína

Agentes reductores	IC ₅₀ nmoles equivalentes de GSH/ 0,1 mg de proteína microsómica
Matico	0,01325 ± 0,00066
Llantén	0,01361 ± 0,00061
Ditioneitol	1,510 ± 0,045
N-acetil-cisteína	2,120 ± 0,064
Cisteína	1,550 ± 0,054

Los valores de IC₅₀ representan la concentración de los agentes reductores testados que inhiben el 50% de la actividad GST microsómica. Los valores de IC₅₀ se obtuvieron de las curvas semi-logarítmicas de concentración del agente reductor *versus* el efecto sobre la actividad GST que se muestran en las Figuras 17, 18, 19, 20 y 21). Las concentraciones tiólicas ensayadas para ambos extractos herbales fluctuaron entre 0,010 y 0,100 μ moles equivalentes de GSH/0,1 mg de proteína microsómica aproximadamente. Para los agentes reductores sintéticos (ditioneitol, N-acetil-cisteína y cisteína) fluctuaron entre 1 y 3 μ moles /0.1 mg de proteína microsómica aproximadamente. La actividad GST se determinó de acuerdo al descrito en la sección Métodos. Cada valor representa el promedio de al menos 4 experimentos independientes \pm DE.

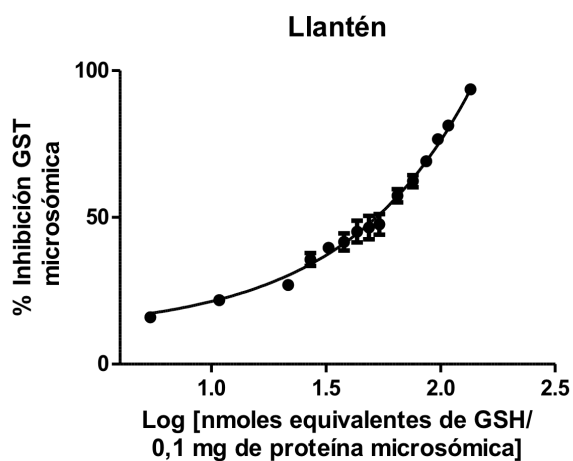
Figura 17. Efecto del extracto de matico sobre la actividad GST microsómica



[nmoles equivalente de GSH/0,1 mg proteína microsómica]	Porcentaje de inhibición de la actividad GST microsómica
14,2	21,99 ± 1,69
28,4	31,49 ± 2,32
42,6	39,24 ± 1,54
56,8	49,41 ± 1,07
71,0	60,53 ± 2,18
85,2	69,77 ± 1,39
99,4	82,99 ± 0,53
113,6	88,00 ± 0,26
127,8	96,81 ± 0,46

La actividad GST se determinó de acuerdo al descrito en la sección Métodos. Los valores representan el promedio de al menos 4 experimentos independientes ± DE.

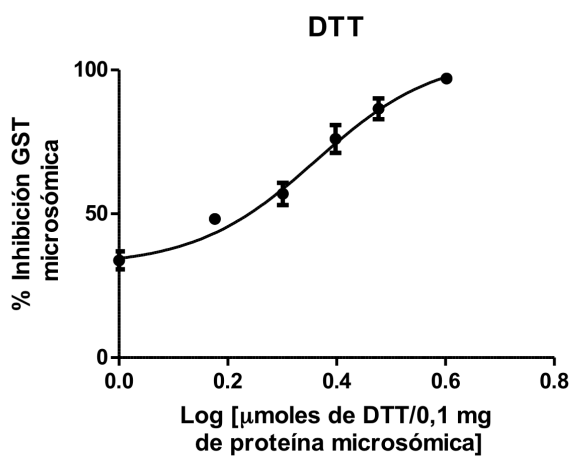
Figura 18. Efecto del extracto de llantén sobre la actividad GST microsómica



[nmoles equivalente de GSH/0,1 mg proteína microsómica]	Porcentaje de inhibición de la actividad GST microsómica
5,4	15,94 ± 0,50
10,8	21,81 ± 1,77
21,6	26,93 ± 1,26
27	35,65 ± 2,19
37,8	41,61 ± 2,89
43,2	45,16 ± 3,70
54	47,64 ± 3,48
64,8	57,40 ± 2,26
86,4	69,10 ± 0,81
97,2	76,66 ± 0,60
108	81,28 ± 1,45
135	93,60 ± 0,80

La actividad GST se determinó de acuerdo al descrito en la sección Métodos. Los valores representan el promedio de al menos 4 experimentos independientes ± DE.

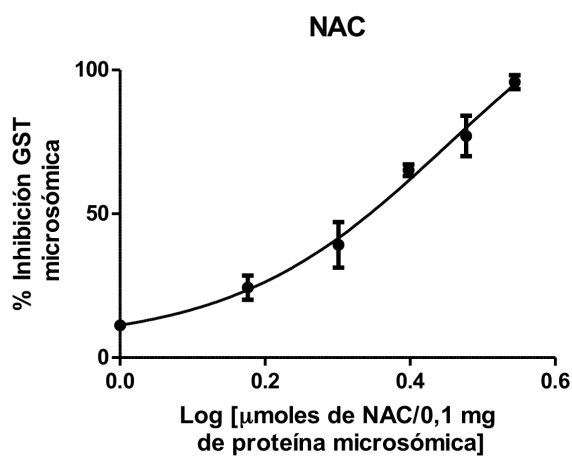
Figura 19. Efecto de ditioneitol (DTT) sobre la actividad GST microsómica



[μ moles equivalente de DTT/0,1 mg proteína microsómica]	Porcentaje de inhibición de la actividad GST microsómica
1,0	33,83 \pm 3,11
1,5	48,21 \pm 0,50
2,0	56,95 \pm 3,88
2,5	76,06 \pm 4,84
3,0	86,51 \pm 3,62
4,0	97,02 \pm 0,80

La actividad GST se determinó de acuerdo al descrito en la sección Métodos. Los valores representan el promedio de al menos 4 experimentos independientes \pm DE.

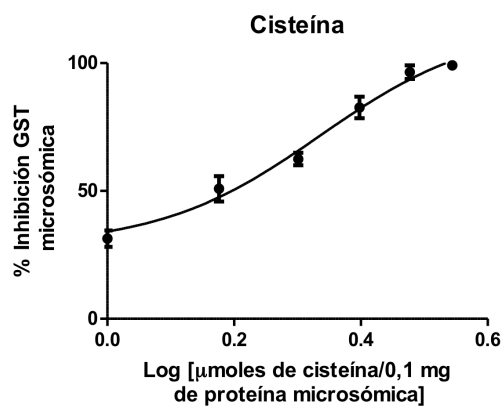
Figura 20. Efecto de N-acetil-cisteína (NAC) sobre la actividad GST microsómica



[μ moles equivalente de NAC/0,1 mg proteína microsómica]	Porcentaje de inhibición de la actividad GST microsómica
1,0	11,19 \pm 1,26
1,5	24,34 \pm 4,19
2,0	39,22 \pm 7,91
2,5	65,19 \pm 2,04
3,0	77,07 \pm 7,02
3,5	95,82 \pm 2,41

La actividad GST se determinó de acuerdo al descrito en la sección Métodos. Los valores representan el promedio de al menos 4 experimentos independientes \pm DE.

Figura 21. Efecto de cisteína sobre la actividad GST microsómica



[μmoles equivalente de Cisteína/0,1 mg proteína microsómica]	Porcentaje de inhibición de la actividad GST microsómica
1,0	31,36 ± 3,21
1,5	50,84 ± 4,93
2,0	62,02 ± 2,43
2,5	82,65 ± 4,20
3,0	96,40 ± 2,99
3,5	99,12 ± 0,04

La actividad GST se determinó de acuerdo al descrito en la sección Métodos. Los valores representan el promedio de al menos 4 experimentos independientes ± DE.

5.3. IMPLEMENTACIÓN DE UN MÉTODO HPLC, PARA DETERMINAR EL PERFIL DE LOS COMPUESTOS FENÓLICOS PRESENTES EN EXTRACTOS HERBALES

Para garantizar el cumplimiento de las normas de calidad y seguridad de los medicamentos, organismos internacionales como la Agencia Europea de Medicamentos (EMA) (18) y la Oficina de Administración de Drogas y Alimentos del Departamento de Servicios Humanos y de Salud de los Estados Unidos (ANDA-FDA) (76), publican periódicamente reportes con las normas a seguir en el desarrollo de métodos analíticos que nos permitan cuantificar la concentración en plasma de un analito o principio activo (21, 76). Bajo estas condiciones, se implementó el método HPLC utilizado en esta tesis.

5.3.1. Condiciones Cromatográficas

Para implementar el método cromatográfico se utilizó primero un equipo HPLC acoplado a un detector UV-visible (73) (HPLC Hitachi Elite LaChrom, autosampler L-2200, bomba L-2130, detector UV-Vis L-2420, columna: Inertsil ODS-3 C18; 250 x 4.6 mm, 5 µm). Posteriormente, se utilizó un equipo HPLC con arreglo de diodo (HPLC Hitachi Elite LaChrom, autosampler L-2200, bomba L-2130, Horno L-2300, detector de arreglo de diode L-2450, columna Purospher Star RP-18; 150 x 4.6 mm, 5 µm), el cual permite aumentar la sensibilidad del método analítico y además, realizar barrido de las muestras en los rangos variables de longitud de onda UV-Visible.

Los estándares utilizados fueron: rutina, quercetina y baicaleína (Sigma-Aldrich), apigenina-7-glucósido (Fluka) y luteolina-7-glucósido (Phytolab). Se describe que quercetina y rutina están presentes en matico, baicaleína en llantén, y apigenina-7-glucósido y luteolina-7-glucósido están presentes en ambos extractos (26, 27, 52, 69). Además, se utilizó catequina (Sigma-Aldrich) como estándar interno ya que este compuesto no está presente en las muestras de los extractos de matico y llantén (26, 27, 52, 69). La Figura 22 muestra las estructuras químicas de los estándares antes mencionados.

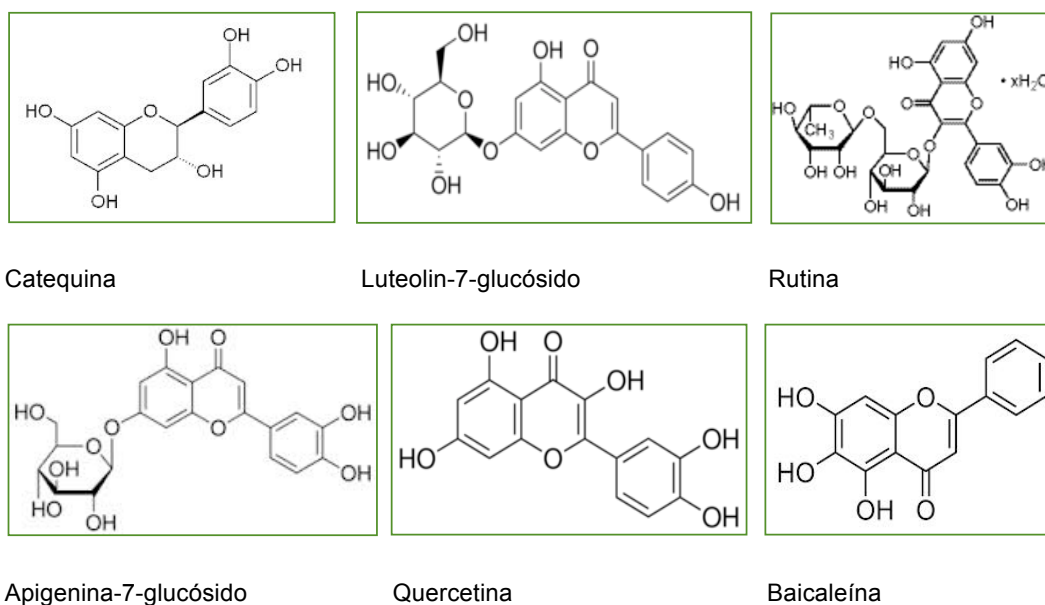


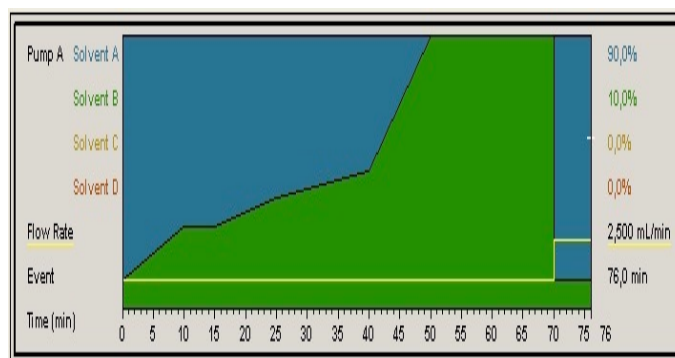
Figura 22. Estructura química de los estándares utilizados

Es importante mencionar que, aunque se ha descrito la presencia de diferentes estándares de polifenoles en estas especies herbales, el método de extracción y el proceso de elaboración del extracto herbal son determinantes para obtener las concentraciones finales de estos estándares, siendo comparable sólo los extractos herbales sometidos a los mismos procesos de extracción y elaboración.

Las condiciones cromatográficas elegidas y la gradiente discontinua de solventes utilizada como fase móvil se muestran en la Tabla 6 y la Figura 23, respectivamente; esta gradiente fue la que proporcionó la mejor resolución de los picos cromatográficos de los estándares polifenólicos y también del estándar interno.

Tabla 6. Condiciones Cromatográficas del método HPLC

Equipo	Sistema HPLC Hitachi Elite LaChrom, autosampler L-2200, bomba L-2130, columna L-2300, detector de arreglo de diodo L-2450.
Columna	Purospher Star RP-18; 150 x 4.6 mm, 5 µm.
Fase Móvil	Fase A= Agua: Ácido Acético (100:1) Fase B= Metanol: ACN: Ácido Acético (90:10:1)
Detección	UV-DAD
Longitud de onda	280 nm (Barrido entre 200-400 nm)
Flujo	1 mL/min
Temperatura	25 °C
Volumen de inyección	40 µL
Tiempo de corrida	76 min
Laboratorio	Farmavet, Laboratorio de Farmacología, Facultad de Ciencias Veterinarias, Universidad de Chile. Dra. Betty San Martín.



Tiempo (min)	Fase A	Fase B
0	90	10
10	70	30
15	70	30
25	60	40
40	50	50
50	0	100
60	0	100
70	0	100
70,1	90	10
76	90	10

Figura 23. Gradiente de solventes utilizada como fase móvil

Las primeras mediciones en el equipo HPLC se realizaron a una longitud de onda fija. En este caso se utilizó 280 nm dado que todos los polifenoles absorben a esta longitud de onda, debido a la presencia del anillo bencénico en ellos. Posteriormente, se utilizó un equipo HPLC con arreglo de diodo que nos permitía aumentar la sensibilidad del método analítico y además, realizar barrido de las muestras en los rangos de longitud de onda UV-Visible, como se mencionó anteriormente. El barrido nos permitió confirmar que todos los estándares en estudio presentaban picos de absorbancia en el rango 270-290 nm; por lo tanto, se decidió utilizar 280 nm como longitud de onda fija para la evaluación de polifenoles. Cabe señalar que aunque muchos polifenoles presentan más de un pico de absorbancia característico, lo común en todos ellos es su absorbancia en la región de 280 nm. Así, las flavonas además de la absorbancia en la región de 280 nm, presentan un pico de absorbancia máximo entre los 340 y 350 nm, el cual se debe a la conjugación del anillo bencénico B con el anillo C que posee el grupo cetónico (31).

5.3.2. Evaluación cromatográfica de los estándares y los extractos obtenida bajo las condiciones del método HPLC implementado

5.3.2.1. Cromatogramas obtenidos con los estándares y los extractos diluidos en solventes

Mezclas de los estándares disueltas en metanol, cuyas concentraciones fluctuaron entre 0,7 y 4 $\mu\text{g}/40 \mu\text{L}$, se eluyeron a 280 nm (Figura 24). En esta figura se aprecia una excelente separación y detección de los estándares seleccionados. En forma similar, muestras de los extractos diluidas en etanol: agua (1:1) en concentraciones entre 1,3 – 145,3 nmoles (0,38 – 42,18 μg) equivalentes de catequina/40 μL para el extracto de matico y 0,5 – 50 nmoles (0,15 – 14,72 μg) equivalentes de catequina/40 μL para el extracto de llantén, se inyectaron al equipo HPLC (Figura 25).

El cromatograma de la mezcla de los estándares corrido a 280 nm mostró picos agudos y separados entre sí, pudiendo distinguir cada analito (estándares de polifenoles) como también, el estándar interno (catequina) (Figura 24). Cabe mencionar que el volumen de mezcla inyectado a la columna fue 40 μL ; las cantidades de los diferentes estándares inyectados a la columna fluctuaron entre 1 y 10 nmoles, y la de estándar interno, 2,5 nmoles. Los cromatogramas obtenidos con los extractos de matico y llantén a la longitud de onda fija (280 nm) se muestran en la Figura 25. En estas condiciones, los cromatogramas de

ambos extractos mostraron varios picos de absorbancia con tiempos de retención diferente. Los tiempos de retención de los picos seleccionados y las longitudes de onda máxima para los estándares y para los extractos, se muestran en la Tabla 7.

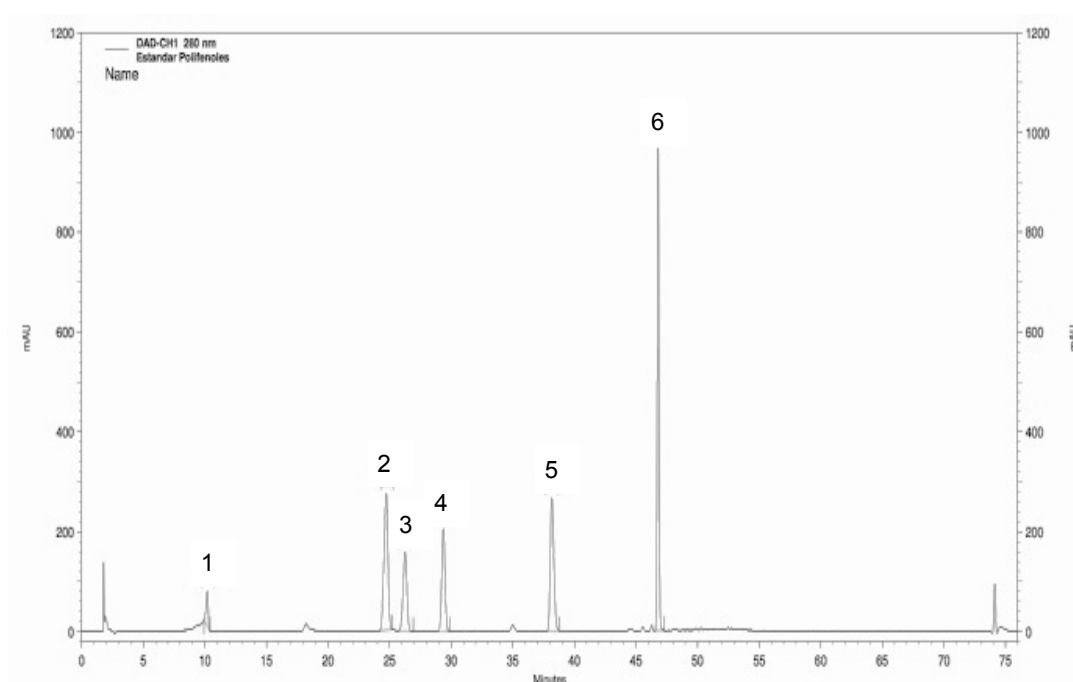


Figura 24: Cromatograma de los estándares de polifenoles determinados a 280 nm. Los números que aparecen sobre los picos corresponden a los estándares ensayados: 1: Catequina; 2: Luteolina-7-glucósido; 3: Rutina; 4: Apigenina-7-glucósido; 5: Quercetina; 6: Baicaleína. Concentración de estándares inyectada a la columna, 2 µg/40 µL. mAU: mili unidades de absorbancia.

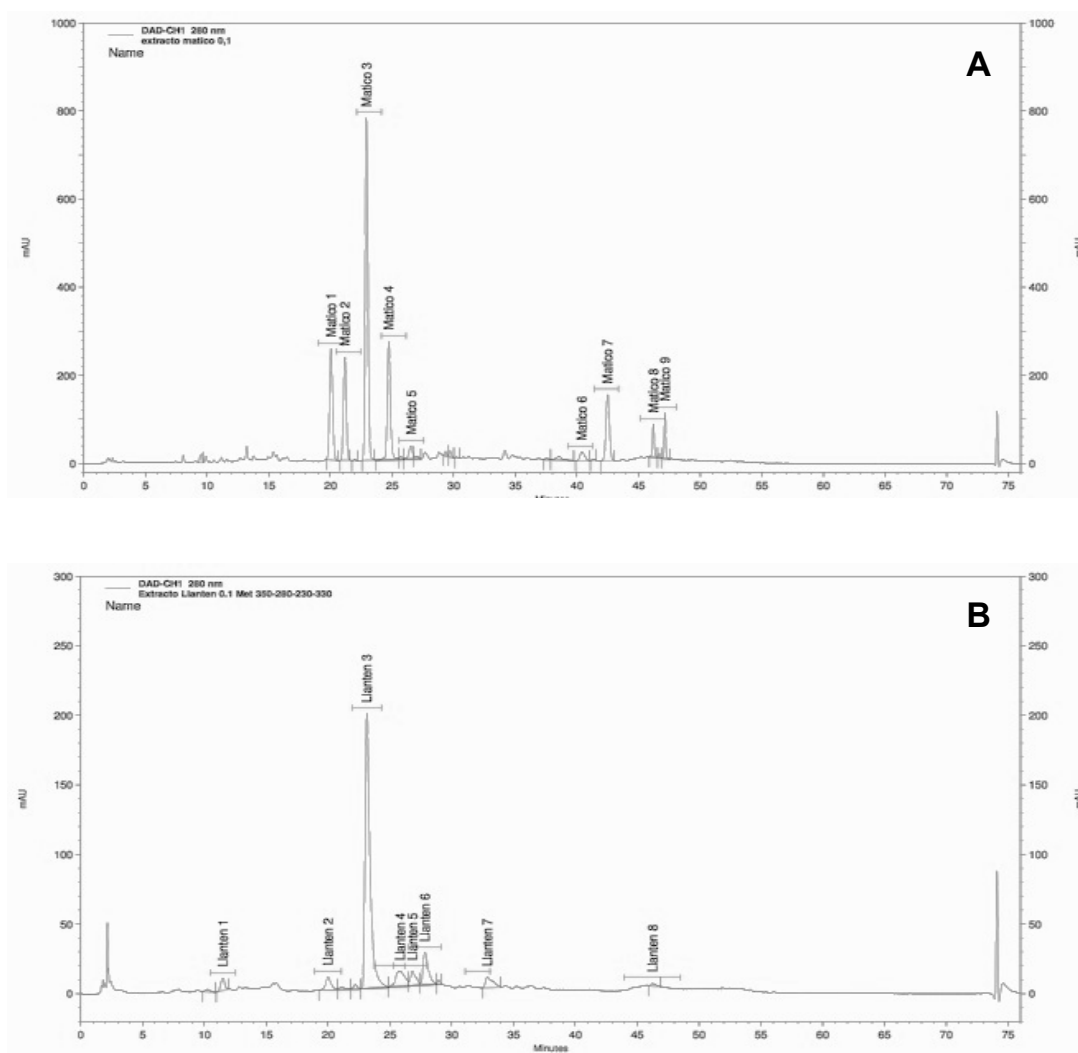


Figura 25: Cromatograma de los extractos de matico (A) y llantén (B) determinados a 280 nm. El volumen de extracto inyectado a la columna cromatográfica fue 40 μ L, los cuales equivalen a 4,0 mg de droga vegetal y a 87,2 y 30,5 η moles equivalentes de catequina para matico y llantén, respectivamente. Los picos señalados en ambas figuras corresponden a los seleccionados para su posterior cromatografía de barrido; 9 para al extracto de matico y 8 para el de llantén. mAU: mili unidades de absorbancia.

Espectros de absorbancia

Nuevos cromatogramas fueron corridos en el rango 200 - 400 nm. Para ello, los picos obtenidos a longitud de onda fija de los estándares y los extractos (9 del extracto de matico y 8 del llantén) fueron analizados fijando sus tiempos de retención obtenidos en las corridas a 280 nm. Los cromatogramas experimentales de los estándares y de los extractos corridos en el rango de longitud de onda 200 – 400 nm aparecen en las Figuras 26, 27 y 28, respectivamente. Los estándares y los extractos mostraron la aparición de 2 o más picos de absorbancia para cada pico seleccionado. A pesar de que algunos picos de los extractos herbales tuvieron tiempos de retención parecidos a los de ciertos estándares, ninguno de ellos coincidió con los cromatogramas de barrido realizadas, demostrando que los compuestos analizados no son los mismos (Tabla 7).

Cabe destacar que picos definidos en la región de 280 nm sólo aparecieron en los cromatogramas de barrido de catequina y baicaleína. La Tabla 7 muestra un resumen de los tiempos de retención de los picos seleccionados y las longitudes de onda de los picos que aparecieron en el barrido realizado a 200 – 400 nm.

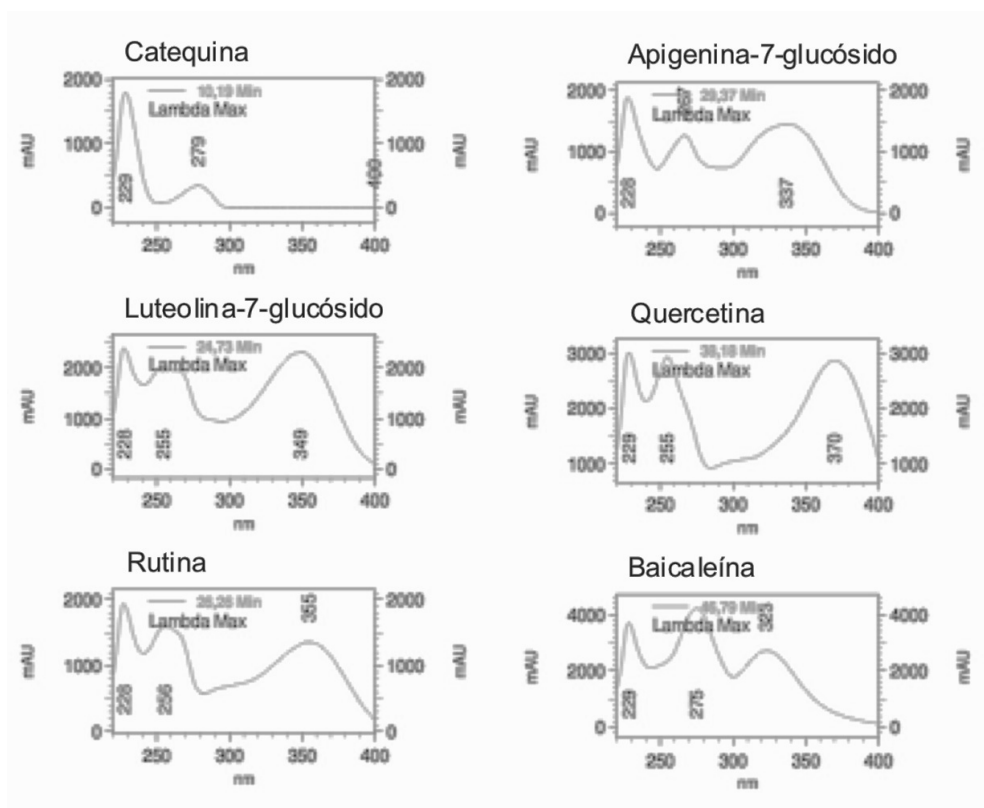


Figura 26. Cromatogramas de barrido de los diferentes estándares. El rango de longitud de onda ensayado fue 200 – 400 nm. Estos cromatogramas se obtuvieron utilizando el tiempo de retención característico del pico a 280 nm de cada estándar (Figura 24, Tabla 7). Los picos observados corresponden a los de mayor absorbancia cuyos valores aparecen escritos en las figuras en forma vertical. nm: longitud de onda. mAU: mili unidades de absorbancia.

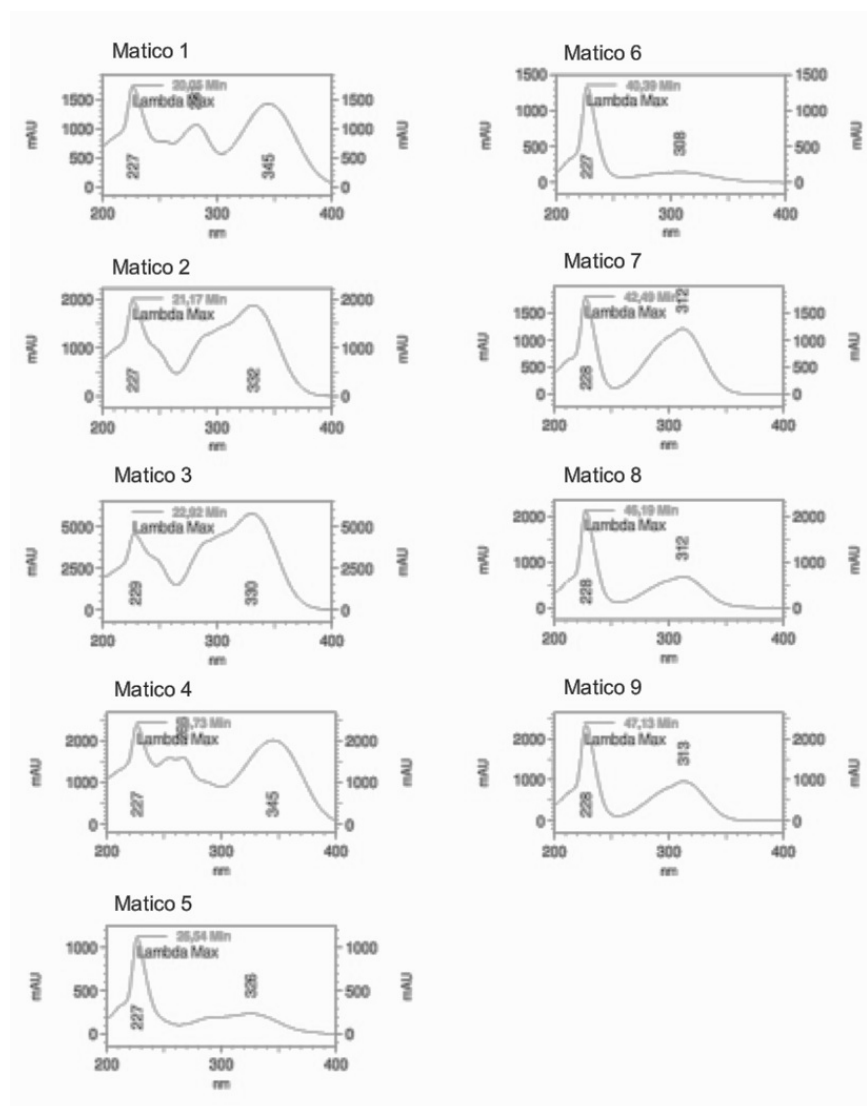


Figura 27. Cromatograma de barrido del extracto de matico. El rango de longitud de onda ensayado fue 200 – 400 nm. Estos cromatogramas se obtuvieron utilizando el tiempo de retención característico del pico a 280 nm del extracto de matico (Figura 25A, Tabla 7). Los picos observados corresponden a los de mayor absorbancia cuyos valores aparecen escritos en las figuras en forma vertical. nm: longitud de onda. mAU: mili unidades de absorbancia.

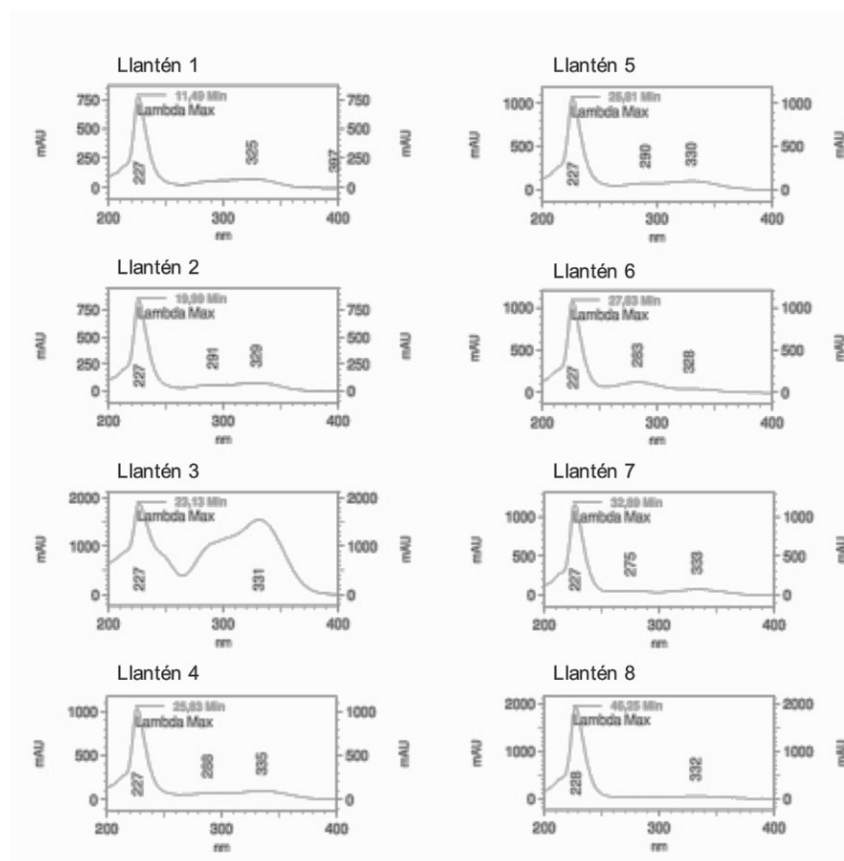


Figura 28. Cromatograma de barrido del extracto de llantén. El rango de longitud de onda ensayado fue 200 – 400 nm. Estos cromatogramas se obtuvieron utilizando el tiempo de retención característico del pico a 280 nm del extracto de llantén (Figura 25B, Tabla 7). Los picos observados corresponden a los de mayor absorbancia cuyos valores aparecen escritos en las figuras en forma vertical. nm: longitud de onda. mAU: mili unidades de absorbancia.

Tabla 7. Tiempos de retención y longitudes de onda máxima de los picos de los analitos seleccionados

Analito	Tiempo de retención (min)	Longitudes de onda máximas (nm)
Estándares		
1. Catequina	10,193	229, 279, 400
2. Luteolina-7-glucósido	24,727	228, 349, 255
3. Rutina	26,260	228, 256, 355
4. Apigenina -7-glucósido	29,367	228, 337, 267
5. Quercetina	38,180	229, 255, 370
6. Baicaleína	46,793	275, 229, 323
Extracto de Matico		
Matico 1	20,047	227, 345, 281
Matico 2	21,167	227, 332
Matico 3	22,920	330, 229
Matico 4	24,727	227, 345, 266
Matico 5	26,540	227, 326
Matico 6	40,387	227, 308
Matico 7	42,487	228, 312
Matico 8	46,187	228, 312
Matico 9	47,133	228, 313
Extracto de Llantén		
Llantén 1	11,493	227, 325, 397
Llantén 2	19,993	227, 329, 291
Llantén 3	23,133	227, 331
Llantén 4	25,833	227, 335, 288
Llantén 5	26,813	227, 330, 290
Llantén 6	27,827	227, 283, 328
Llantén 7	32,887	227, 333, 275
Llantén 8	46,253	228, 332

Los tiempos de retención fueron obtenidos a partir de los cromatogramas que se muestran en las figuras 24 y 25. Los números que acompañan a los analitos corresponden a los picos seleccionados de acuerdo a su tiempo de retención creciente.

5.3.2.2. Cromatogramas de los estándares y los extractos previamente solubilizados en plasma sanguíneo

Para implementar el método de análisis HPLC para los estándares de polifenoles, se utilizó plasma humano donado por el Laboratorio Clínico del Hospital San Juan de Dios al Laboratorio de Investigaciones Farmacológicas y Toxicológicas (IFT). No se pudo utilizar plasma de rata, debido al restringido volumen que se obtiene de estos animales: aproximadamente 5 mL de sangre, lo que corresponde a alrededor de 2,5 mL de plasma por rata. Es por ello que para la realización de estos ensayos se utilizaron muestras de plasma obtenidas de voluntarios sanos recolectados en tubos con anticoagulante EDTA y sometidas a centrifugación.

Tratamiento de las muestras de plasma

Las muestras de plasma humano se mezclaron en forma conjunta con los estándares de catequina, rutina, quercetina, baicaleína, apigenina-7-glucósido y luteolina-7-glucósido (26, 27, 52, 69). Luego se precipitaron las proteínas plasmáticas de las muestras. Para ello, se probó la precipitación de proteínas con HCl 0,5 N (concentración final en la mezcla de extracción, 0,125 N), ácido acético concentrado (concentración final en la mezcla de extracción, 0,5 N) y diferentes solventes orgánicos: etanol, metanol, acetonitrilo, acetato de etilo, acetona y dietiléter. Las muestras así tratadas fueron centrifugadas durante 10 min a 3.000 rpm en una centrifuga Jouan GR412 refrigerada a 4 °C. Los

sobrenadantes obtenidos fueron llevados a sequedad en baño maría bajo una corriente de nitrógeno. El sedimento así obtenido fue resuspendido en 300 μL de fase móvil para luego ser analizado. El tratamiento que mostró una mejor extracción de los compuestos en estudio, aparece en la Figura 29.

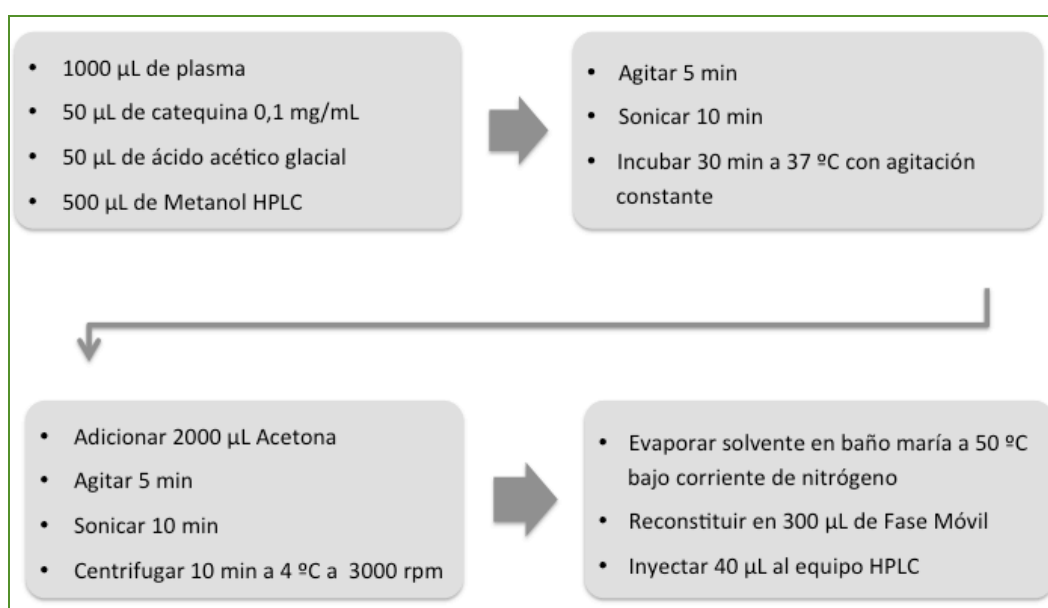


Figura 29. Preparación de la muestra de plasma para su inyección en el equipo HPLC

Cromatogramas de los estándares y los extractos solubilizados en plasma sanguíneo

El sobrenadante obtenido de la muestra de plasma humano y catequina, utilizado como estándar interno, mostró un pico inicial que corresponde al frente del solvente y un pico pequeño que aparece antes de la catequina (Figura 30). El cromatograma de la mezcla de estándares en plasma presentó 6 picos, 5 de ellos correspondieron a los 5 estándares en ensayo y el sexto, a la catequina (Figura 31). Los tiempos de retención de estos picos fueron todos mayores que los de la catequina.

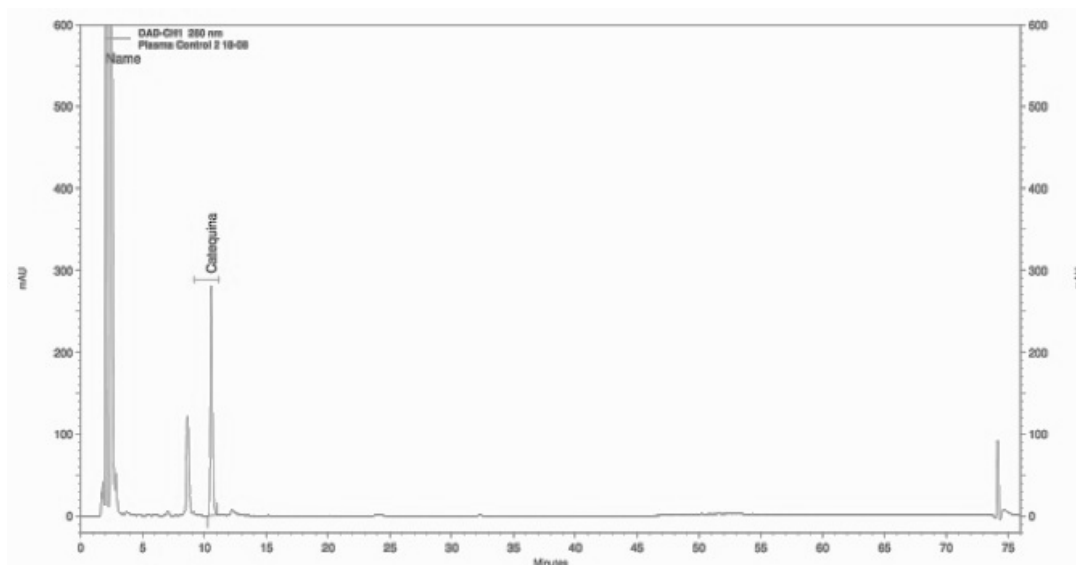


Figura 30. Cromatograma de plasma humano en presencia de catequina determinado a 280 nm. La concentración de catequina fue 7 $\mu\text{g}/40 \mu\text{L}$. mAU: mili unidades de absorbancia.

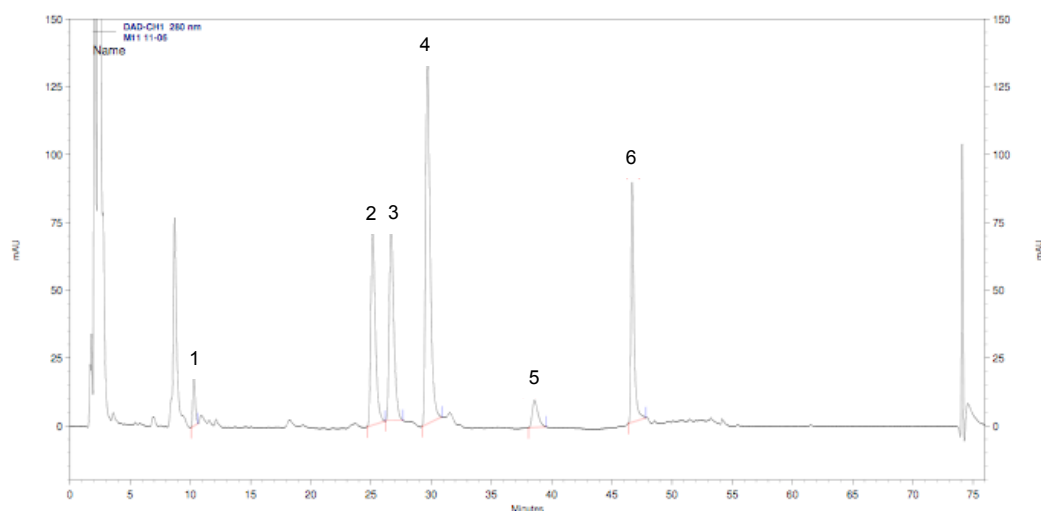


Figura 31. Cromatograma de la mezcla de estándares solubilizados en plasma humano determinado a 280 nm. Los números que aparecen sobre los picos corresponden a: 1: Catequina; 2: Luteolina-7-glucósido; 3: Rutina; 4: Apigenina-7-glucósido; 5: Quercetina; 6: Baicaleína. La concentración de los estándar en la mezcla fue 4 $\mu\text{g}/40\ \mu\text{L}$, excepto para el estándar interno que fue 0,7 $\mu\text{g}/40\ \mu\text{L}$. mAU: mili unidades de absorbancia.

Los cromatogramas de los extractos de matico y llantén en plasma se muestran en la Figura 32. En ella se muestra que el número de picos como también los tiempos de retención de los mismos, fueron idénticos a aquellos observados para las muestras de extractos disueltas en solvente (Figura 25). Cabe destacar que los picos que aparecieron en el control, no interfirieron con los de los estándares ni con los de los extractos de matico y llantén; los tiempos de retención de los picos de estos analitos fueron todos mayores que los de catequina. Más aún, los tiempos de retención de dichos picos y sus espectros fueron diferentes a los de los estándares utilizados como referentes.

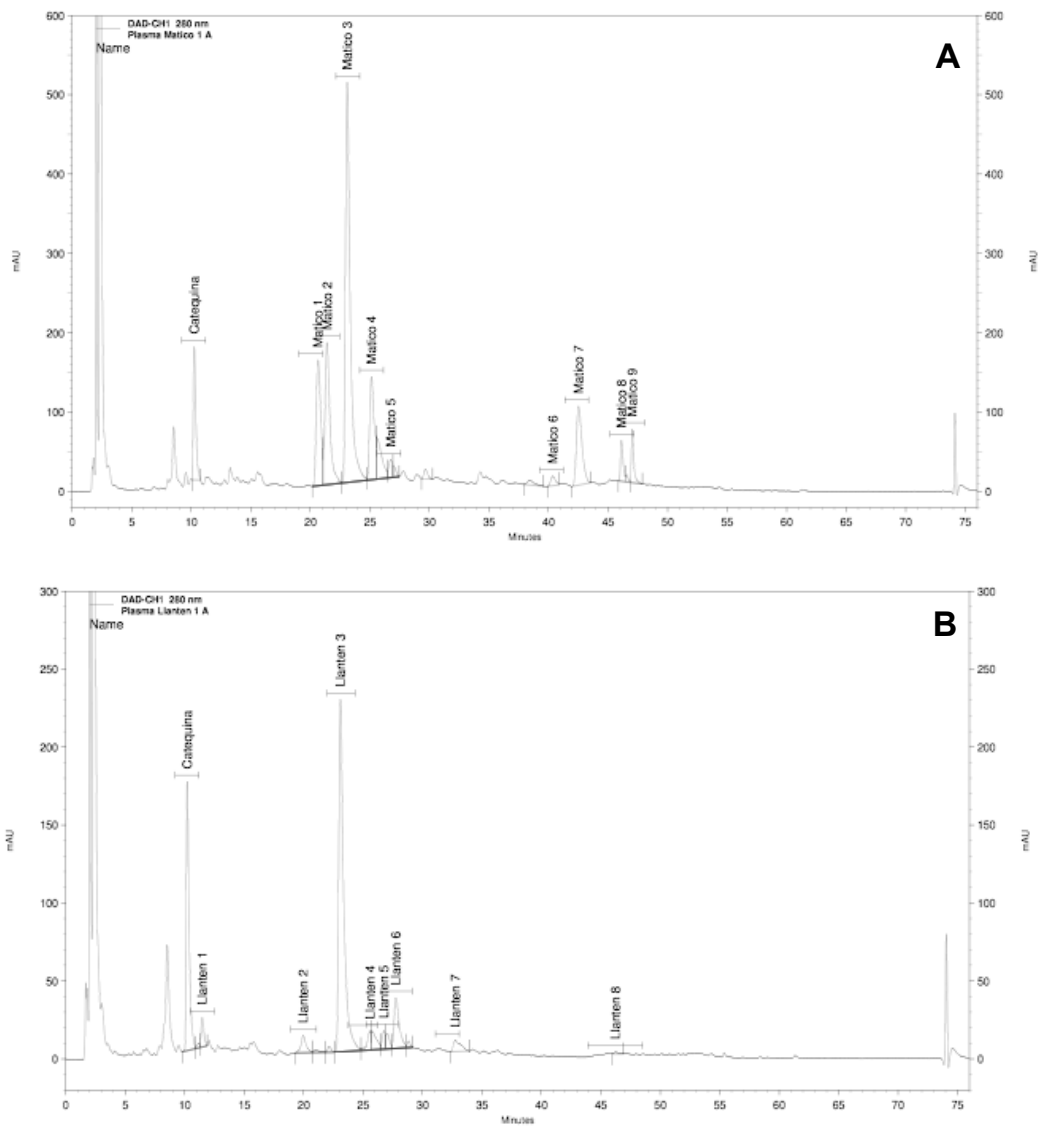


Figura 32. Cromatograma de matico (A) y llantén (B) en plasma humano determinado a 280 nm. mAU: mili unidades de absorbancia. La concentración de catequina fue 7 µg/40 µL, del extracto de matico 42,18 y del extracto de llantén 14,72 µg equivalentes de catequina/40 µL. mAU: mili unidades de absorbancia.

5.3.2.3. Curvas de calibración

Aunque ninguno de los picos cromatográficos obtenidos en ambos extractos herbales coincidieron con los estándares utilizados y que aparecen descritos en la literatura; se decidió realizar curvas de calibración para los estándares y también para los picos seleccionados en plasma de los cromatogramas resultantes del extracto de matico y de llantén (Figuras 33, 34 y 35). Las concentraciones utilizadas fluctuaron entre 0,7 y 4,0 $\mu\text{g}/40 \mu\text{L}$ para los estándares en estudio, y para el extracto de matico y llantén se utilizaron rangos de concentraciones entre 0,38 - 42,18 y 0,15 - 14,72 μg equivalentes de catequina/40 μL , respectivamente (Tabla 8).

Tabla 8. Rango de concentraciones de los estándares y de los extractos herbales testeadas para la construcción de las curvas de calibración

Estándar μg	Matico			Llantén		
	ηmoles equiva- lentes de catequina	μg equiva- lentes de catequina	mg de extracto seco	ηmoles equiva- lentes de catequina	μg equiva- lentes de catequina	mg de extracto seco
0,7	1,3	0,38	1,35	0,5	0,15	1,22
1,3	2,7	0,78	2,81	1,1	0,32	2,68
2,0	8,0	2,32	8,33	2,7	0,78	6,59
2,7	14,7	4,27	15,31	5,3	1,54	12,93
3,3	37,3	10,83	38,85	13,3	3,86	32,44
4,0	73,3	21,28	76,35	25,3	7,34	61,71
-	145,3	42,18	151,35	50,7	14,72	123,66

Las concentraciones descritas corresponden a las inyectadas en un volumen de 40 μL al equipo HPLC.

Las curvas de calibración se construyeron graficando la concentración del analito inyectado a la columna *versus* la relación de áreas. Esta relación se obtuvo dividiendo el área de cada analito por el área del estándar interno. Todas las curvas de los estándares analizados, mostraron una dependencia lineal del área respecto de la concentración de los analitos. Más aún, todas las rectas obtenidas mostraron coeficientes de regresión lineal (r) superiores a 0,99 y los F calculados fueron menores a los F de tabla. En la Tabla 9 se muestran los tiempos de retención, las ecuaciones de regresión lineal, los coeficientes de regresión lineal (r) y la prueba de carencia de ajuste (F) de los estándares utilizados (Tabla 8).

Tabla 9. Resumen de parámetros analíticos de las curvas de calibración de los estándares de polifenoles utilizados

Estándar de polifenoles	Tiempo de Retención (min)	Ecuación Regresión Lineal	r	F (Fcal<Ftabla)
Luteolina-7-glucosido	25,320	$y = 0,2894x - 0,1159$	0,999	(2,41<2,62)
Apigenina-7-glucosido	26,707	$y = 0,2543x + 0,1197$	0,996	(1,83<2,62)
Rutina	29,740	$y = 0,5162x - 0,7446$	0,995	(1,61<2,62)
Quercetina	38,660	$y = 0,0638x - 0,1711$	0,998	(0,37<3,49)
Baicaleína	46,727	$y = 0,3183x - 0,794$	0,997	(0,19<2,62)

r: coeficiente de regresión lineal. F: prueba de carencia de ajuste (Fcal: F calculado; Ftabla: F de tabla; el valor de F calculado debe ser menor que el valor F de tabla).

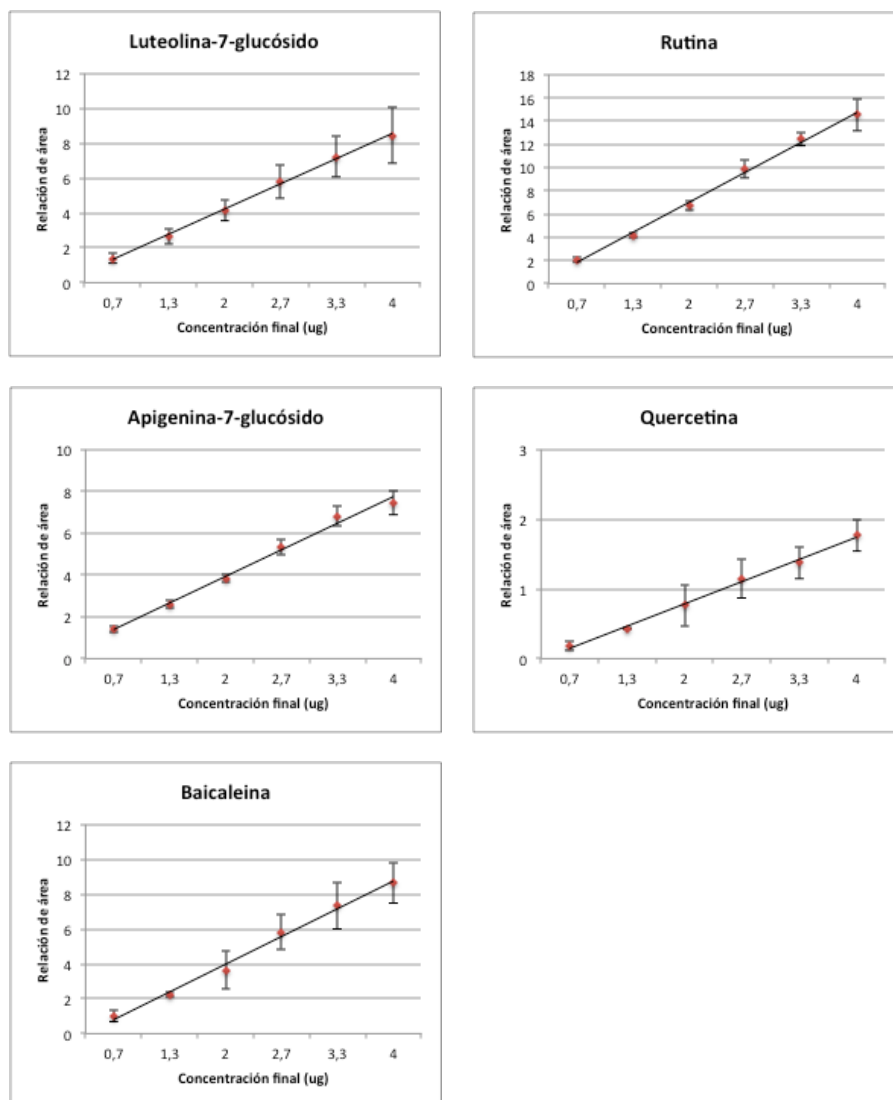


Figura 33. Curvas de Calibración de los estándares de polifenoles utilizados disueltos en plasma. La relación de área representa la razón entre el estándar evaluado y el estándar interno. Las concentraciones de los estándares utilizadas fluctuaron entre 0,7 y 4,0 µg equivalentes de catequina/40 µL. Cada punto en las rectas representa el promedio de la menos 5 experimentos independientes ± DE.

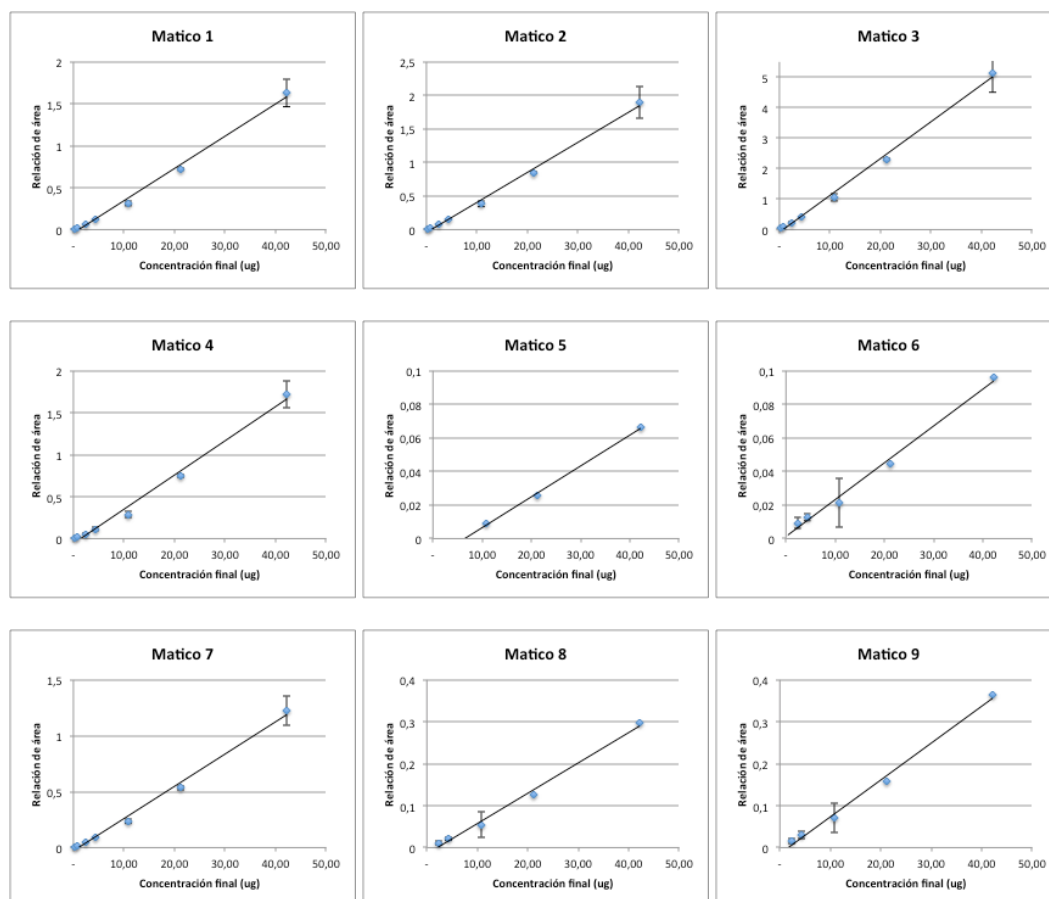


Figura 34. Curvas de Calibración para el extracto de matico disuelto en plasma. Cada gráfico corresponde a cada uno de los picos observados en la Figura 32A. Las concentraciones de matico utilizadas fluctuaron entre 0,38 y 42,18 μg equivalentes de catequina/40 μL . Cada punto en las rectas representa el promedio de al menos 5 experimentos independientes \pm DE. El número de puntos graficados en cada recta depende del área que el equipo utilizado es capaz de medir.

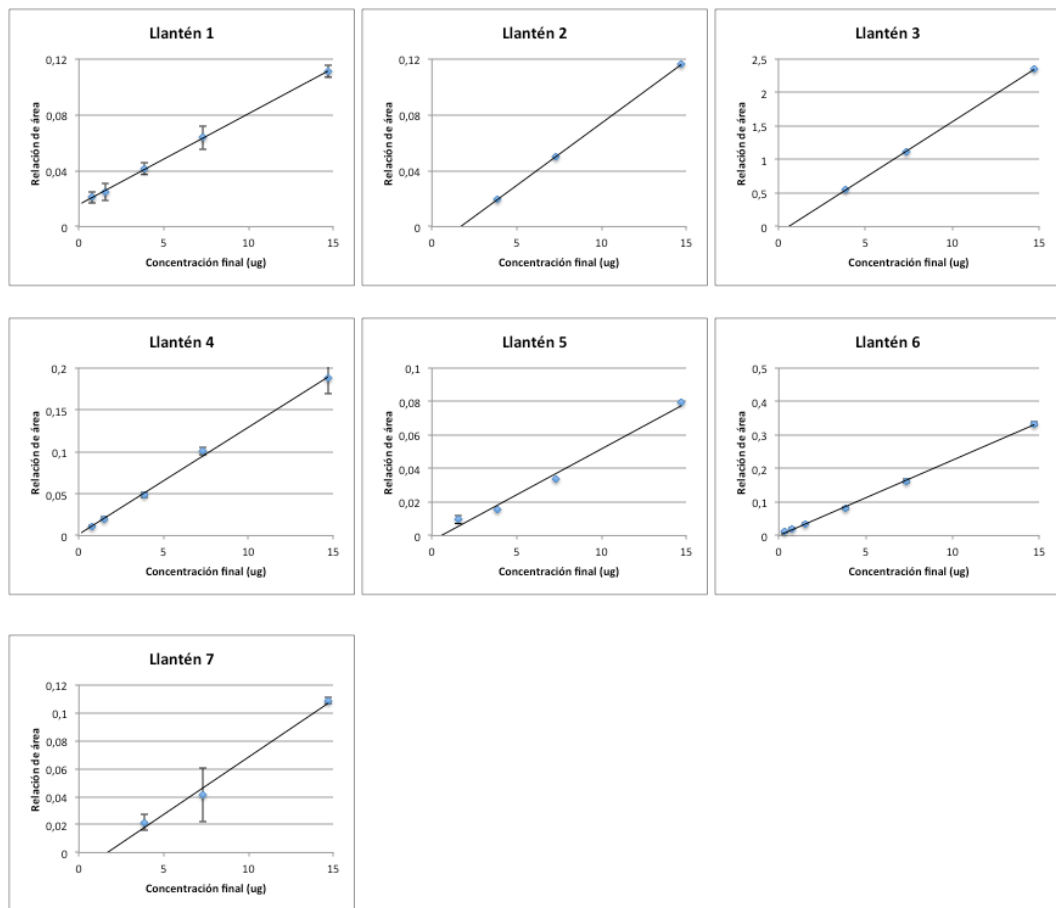


Figura 35. Curvas de Calibración para el extracto de llantén disuelto en plasma. Cada gráfico corresponde a cada uno de los picos observados en la Figura 32B a excepción del pico 8 que fue el más pequeño. Las concentraciones de llantén utilizadas fluctuaron entre 0,15 y 14,72 µg equivalentes de catequina/40 µL. Cada punto en las rectas representa el promedio de al menos 5 experimentos independientes ± DE. El número de puntos graficados en cada recta depende del área que el equipo utilizado es capaz de medir.

5.4. CONCENTRACIÓN DE POLIFENOLES PLASMÁTICOS EN RATAS SPRAGUE-DAWLEY TRATADAS CON DIFERENTES DOSIS ORALES DE LOS EXTRACTOS DE MATICO Y LLANTÉN

Implementado el método HPLC, se procedió a evaluar las muestras de plasma de las ratas tratadas oralmente con los extractos de matico y llantén. Las dosis administradas para matico fueron 0,546 y 5,46 mg equivalentes de catequina/Kg de peso animal. Asimismo, las dosis para el llantén fueron 0,546 y 2,73 mg equivalentes de catequina/Kg de peso animal. Estas dosis fueron utilizadas en estudios en ratas y en pacientes del Hospital Clínico de la Universidad de Chile por nuestro Laboratorio (manuscrito en revisión). La dosis más bajas mencionadas corresponden a las utilizadas en pacientes.

Las muestras de plasma obtenidas de las ratas se trataron bajo las condiciones establecidas anteriormente (Figura 29). Aunque se utilizó un equipo HPLC con arreglo de diodo y se aumentó el volumen de plasma 5 veces, desde 0,2 mL a 1,0 mL; desafortunadamente, los resultados obtenidos a los diferentes tiempos estudiados (0 a 12 h) fueron negativos. Cabe destacar que los extractos herbales ensayados son polivalentes en relación a la presencia de principios activos antioxidantes. Por lo tanto, la concentración individual de probablemente la mayoría de estos principios es muy baja, lo cual podría explicar los resultados negativos obtenidos. Además la biodisponibilidad de los polifenoles varía entre un 15 - 60% (15, 46, 56, 62, 95). Esta variación depende del polifenol en

estudio, las condiciones fisiológicas, alimenticias, ambientales y los procesos de absorción, distribución, metabolización y excreción de cada individuo.

Los cromatogramas obtenidos tanto de las muestras de plasma de los grupos tratados como controles, mostraron un único pico cromatográfico el cual correspondió a catequina, utilizada como estándar interno. Como un ejemplo, se muestran los cromatogramas de las muestras analizadas del grupo Control, Matico B y Llantén B a las 2 h post-administración oral de los extractos; los cuales corresponden a las Figuras 36, 37 y 38, respectivamente.

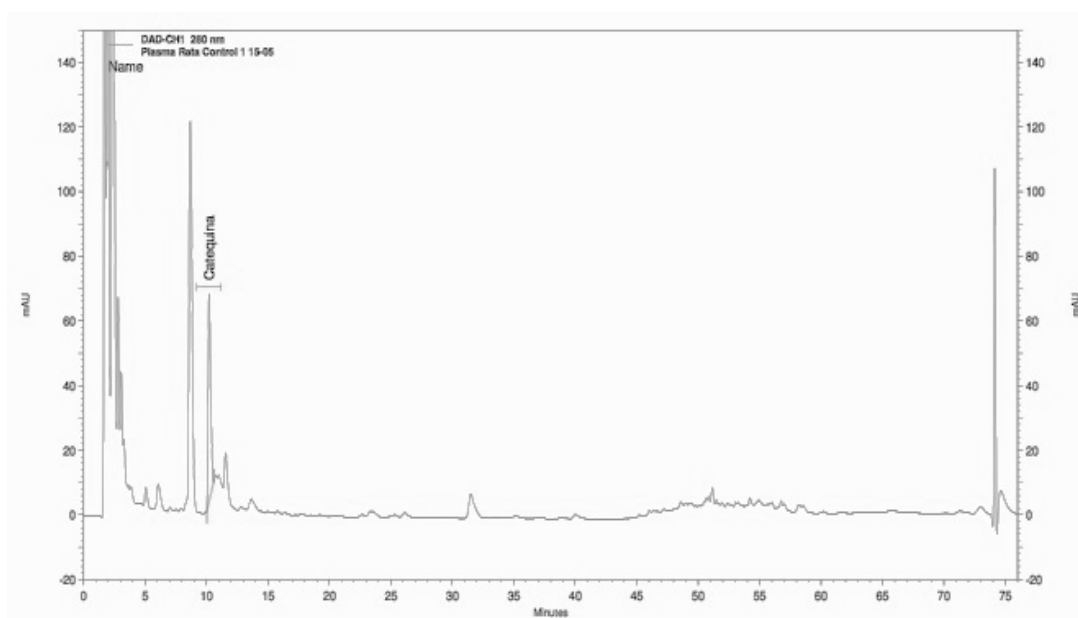


Figura 36. Cromatograma de plasma de rata del grupo control determinado a 280 nm. El cromatograma se obtuvo de la muestra de plasma de rata del grupo control extraída a las 2 h post-administración de agua. mAU: mili unidades de absorbancia.

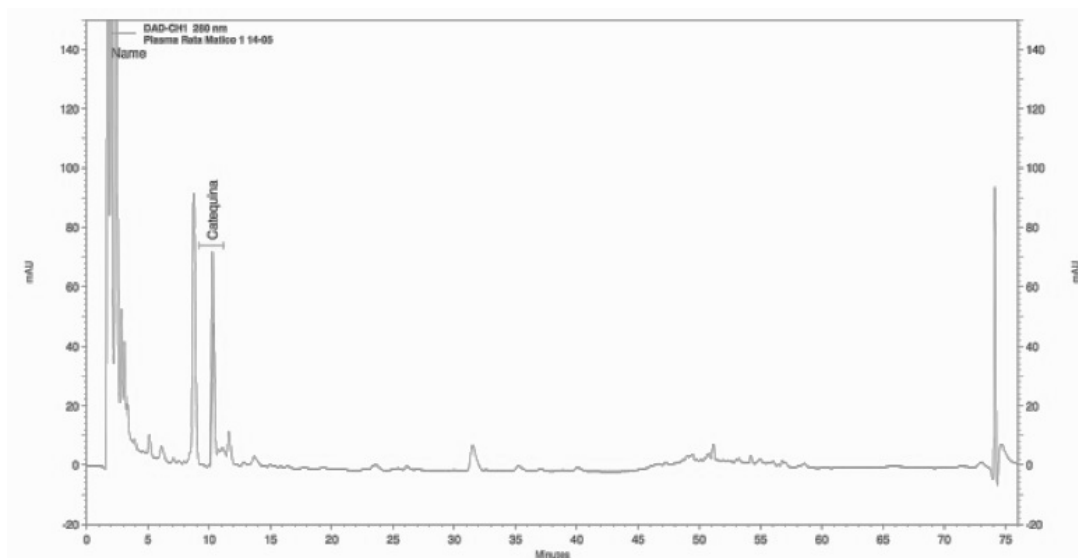


Figura 37. Cromatograma de plasma de rata tratada con extracto de matico. El cromatograma se obtuvo de la muestra de plasma de rata del grupo Matico B (dosis: 5,46 mg equivalentes de catequina/Kg de peso vivo) extraída a las 2 h post-administración del extracto de matico. mAU: mili unidades de absorbancia.

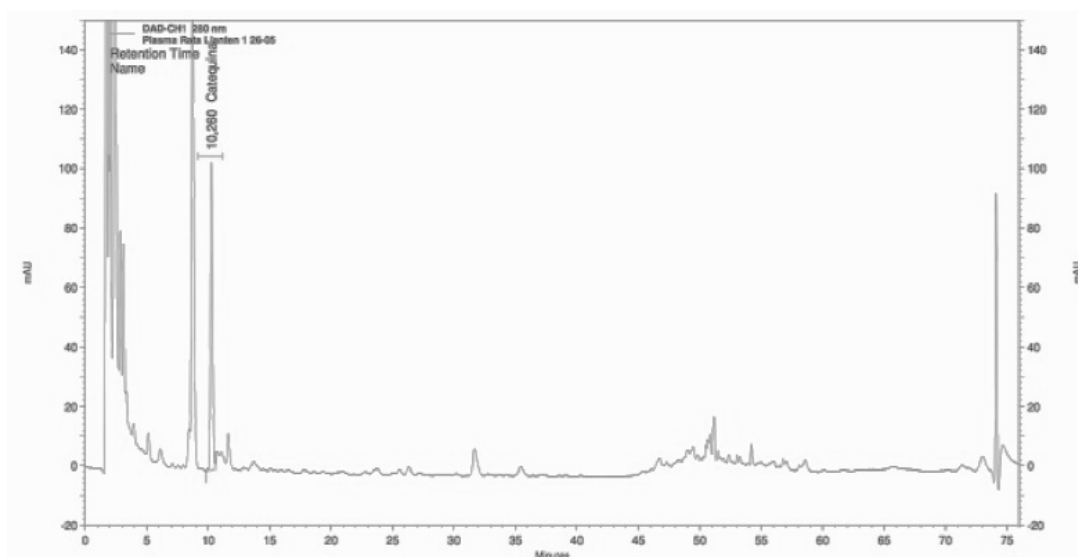


Figura 38. Cromatograma de plasma de rata tratada con extracto de llantén. El cromatograma se obtuvo de la muestra de plasma de rata del grupo Llantén B (dosis: 2,73 mg equivalentes de catequina/Kg de peso vivo) extraída a las 2 h post-administración del extracto de llantén. mAU: mili unidades de absorbancia.

5.4.1. Validación del método HPLC implementado

Si bien los resultados fueron negativos, pensamos que este método HPLC implementado, podría ser utilizado en la obtención de:

- a) Perfiles cromatográficos característicos de extractos herbales que se utilizan en la formulación de fitofármacos (fingerprint).
- b) Parámetros farmacocinéticos. Esto requiere sin embargo, que previamente se seleccione alguno de los picos del fingerprint, para luego determinar su concentración. Cabe señalar que estos estudios deberían realizarse para cada extracto estandarizado, ya que cada cual tiene su propia composición química, aunque provenga de la misma droga vegetal.

Es por ello que a pesar de no poder cuantificar polifenoles en plasma de animales tratados con los extractos, se decidió validar este método cromatográfico.

Los parámetros evaluados fueron los siguientes: selectividad, linealidad, arrastre, exactitud y precisión (18). La validación de un método HPLC para fármacos sintéticos, se realiza usualmente con un estándar. En este caso se utilizaron 2 estándares de polifenoles con estructura química diferente, apigenina-7-glucósido y rutina, para validar el método HPLC implementado. Las curvas de calibración de estos estándares se muestran en la Figura 33.

Las rectas observadas responden a la siguiente ecuación:

$$y=mx+n$$

Dónde:

y= relación de área entre el analito y el estándar interno

m= pendiente de la recta

n= intercepto de la recta

x= concentración plasmática del analito en $\mu\text{g/mL}$

Selectividad: Es la propiedad del método analítico para detectar un analito, aún en presencia de otros componentes como impurezas, productos de degradación o componentes de la formulación. Es por ello que se compararon las lecturas cromatográficas de muestras blanco (cromatograma de plasma), respecto de muestras de estándares. Se utilizaron 6 fuentes diferentes de plasma humano para determinar si esta matriz presentaba interferencias con los analitos en estudio. El análisis de la relación de área entre los picos de los plasmas utilizados con respecto al estándar interno no mostró interferentes en los tiempos de retención de los estándares utilizados. Estos resultados se muestran en la Tabla 10.

Tabla 10. Evaluación de interferentes en las muestras de plasma

PLASMA		Relación de Área (RA)				
		Apigenina 7G	Rutina	Quercetina	Luteolina 7G	Baicaleína
1	REF	ND	$8,559 \times 10^{-8}$	ND	$5,076 \times 10^{-3}$	ND
2	CON	ND	ND	ND	ND	ND
3	JSA	ND	ND	ND	ND	ND
4	CAS	ND	ND	ND	ND	ND
5	JRG	ND	ND	ND	ND	ND
6	AMS	ND	$4,251 \times 10^{-7}$	ND	ND	ND

El límite menor de área se fijó en 50 mUA (mili unidades de absorbancia), ya que áreas menores a esta son consideraran insignificantes para causar interferencia. ND: No detectado (el equipo HPLC utilizado no entrega valores de área menores a 50 mUA).

Arrastre: Corresponde a la interferencia que pueden generar analitos retenidos en la columna y provenientes de corridas anteriores. Para corroborar esto se inyectó fase móvil en ausencia de analitos. El análisis de los cromatogramas no evidenció arrastre de compuestos. Para verificar este parámetro en forma rutinaria, este procedimiento se llevó a cabo cada 6 muestras corridas.

Linealidad: Es la capacidad del método analítico de entregar respuestas directamente proporcionales a la concentración del analito en la muestra. Así, el gráfico de estos resultados muestra una recta que contiene el rango de concentración en el cual se puede cuantificar el analito. La Figura 33 muestra las rectas obtenidas de las curvas de calibración de los estándares utilizados.

Exactitud y Precisión: Exactitud es la cercanía de los resultados de las mediciones, con el valor verdadero. Se calcula de acuerdo al error relativo. Precisión es el grado de dispersión entre los resultados de una serie de mediciones correspondientes a una misma muestra biológica. Se expresa como la desviación estándar y coeficiente de variación.

La exactitud se calculó de acuerdo al error relativo:

$$\text{Exactitud} = \frac{[\text{analito}] \text{ obtenida} \times 100}{[\text{analito}] \text{ nominal}}$$

El Coeficiente de variación (CV) es una medida de la dispersión relativa de un conjunto de datos, que se obtiene dividiendo la desviación estándar por el promedio y se expresa en términos porcentuales. Se calculó utilizando la siguiente ecuación:

$$\text{CV} = \frac{\text{DE}}{\text{Promedio}} \times 100$$

De acuerdo a la FDA, para cada nivel de concentración, el error relativo y el CV debe ser menor al 15%, excepto para la concentración más baja, donde se acepta un porcentaje menor al 20% (18).

Los resultados de estos análisis para apigenina-7-glucósido y para rutina se muestran en las Tablas 11 y 12, respectivamente. En ellas aparecen los porcentajes de exactitud y de error, además del coeficiente de variación (CV) calculados de los resultados obtenidos.

Tabla 11. Exactitud, error y coeficiente de variación de las mediciones realizadas para apigenina-7-glucósido

Apigenina-7glucósido [µg/mL]	RA	[Apigenina-7-glucósido Experimental]	[Real]/ [Experimental]	Exactitud (%)	Error Relativo (%)	CV (%)
5	1,39	5,01 ± 0,15	1,01	100,19	0,19	10,99
10	2,59	9,71 ± 0,17	0,97	97,08	2,92	6,60
15	3,84	14,63 ± 0,19	0,98	97,55	2,45	4,85
20	5,32	20,45 ± 0,35	1,02	102,24	2,24	6,55
25	6,82	26,33 ± 0,48	1,05	105,31	5,31	7,04
30	7,46	28,88 ± 0,58	0,96	96,25	3,75	7,76

Cada valor de concentración experimental, representa el promedio de al menos 5 experimentos independientes ± DE. RA: relación de área entre los picos de los estándares utilizados con respecto al estándar interno.

Tabla 12. Exactitud, error y coeficiente de variación de las mediciones realizadas para rutina

Rutina [µg/mL]	RA	[Rutina Experimental]	[Real]/ [Experimental]	Exactitud (%)	Error Relativo (%)	CV (%)
5	2,03	5,38 ± 0,21	1,08	107,67	7,67	10,32
10	4,11	9,40 ± 0,25	0,94	94,01	5,99	6,10
15	6,71	14,45 ± 0,39	0,96	96,30	3,70	5,76
20	9,87	20,57 ± 0,77	1,03	102,82	2,82	7,81
25	12,90	26,44 ± 1,18	1,06	105,75	5,75	9,18
30	14,17	28,89 ± 1,43	0,96	96,29	3,71	10,09

Cada valor de concentración experimental, representa el promedio de al menos 5 experimentos independientes ± DE. RA: relación de área entre los picos de los estándares utilizados con respecto al estándar interno.

Evaluación de los estándares de polifenoles a través de espectrometría de masa

Como se mencionó anteriormente, no se pudo detectar la presencia de los estándares seleccionados en los extractos herbales de matico y llantén, a través de un equipo HPLC con arreglo de diodo. Al respecto se postuló que las concentraciones de estos estándares en las muestras de extractos eran demasiado pequeñas para ser detectadas por el HPLC utilizado. Es por ello que se decidió utilizar un equipo de espectrometría de masas: HPLC Masa con triple cuadrupolo (LC/MS/MS), que mide la masa de los iones y su abundancia; para determinar la presencia de los estándares seleccionados en los extractos herbales en estudio. Para determinar la masa de los iones presentes, la muestra se ioniza y se evapora, así las moléculas cargadas presentes en la solución pueden ingresar al analizador de masas y posteriormente al transductor o detector (48). El proceso de ionización se llevó a cabo a través de electro-spray, el cual se utiliza para moléculas solubles en agua y solventes orgánicos.

Para caracterizar las moléculas de los estándares se realizó una inyección por infusión continua. Esta forma de inyección entrega pequeños flujos de forma exacta y constante, y se utiliza principalmente para calibrar y optimizar las condiciones del equipo. La muestra se inyecta directamente al equipo de masa,

sin pasar por el módulo HPLC, permitiendo una lectura más rápida a tiempo real. Las especificaciones técnicas utilizadas, se detallan en la Tabla 13.

Tabla 13. Especificaciones técnicas empleadas para caracterizar las moléculas de los estándares de polifenoles por espectrometría de masas

Parámetro	Especificaciones técnicas
Equipo	HPLC Masa con triple cuadrupolo (LC/MS/MS) Applied biosystems 5500
Detección	Ionización modo negativo (Modo ESI -)
Flujo	7 uL/min
Inyección	Infusión
Temperatura de la fuente	200 °C
Voltaje de la fuente	-3200 a -4000

Se analizaron las muestras en modo positivo y negativo, siendo mayor la abundancia en modo negativo, por lo que se elige este modo para la detección de los estándares de polifenoles.

La espectrometría de masas trabaja sólo con especies cargadas, es decir, iones en estado gaseoso. Los espectros de masa presentan los datos según la relación masa/carga (m/z), es decir, la relación entre la masa y la carga eléctrica del fragmento. Cuando las moléculas de la muestra son ionizadas en la fuente (en este caso ionización por electro-spray ESI), parte de la energía introducida hace que las moléculas se fragmenten, en fragmentos característicos para cada molécula, los que ayudan a corroborar la identificación de la molécula madre (48).

En equipos LC/MS/MS, la fuente se encarga de ionizar la muestra ingresada. El ion formado se transporta al cuadrupolo que se divide en 4 secciones: Q0-Q1-Q2-Q3. Q0 filtra la muestra de impurezas mayores; Q1 selecciona el ion precursor o madre. Según el potencial (voltaje) seleccionado, el ion pasa a Q2 donde el ion madre se fragmenta y finalmente se dirige a Q3 donde se filtran los iones fragmentados, los cuales ingresan al detector. En la Figura 39 se pueden observar los componentes mencionados de un equipo LC/MS/MS.

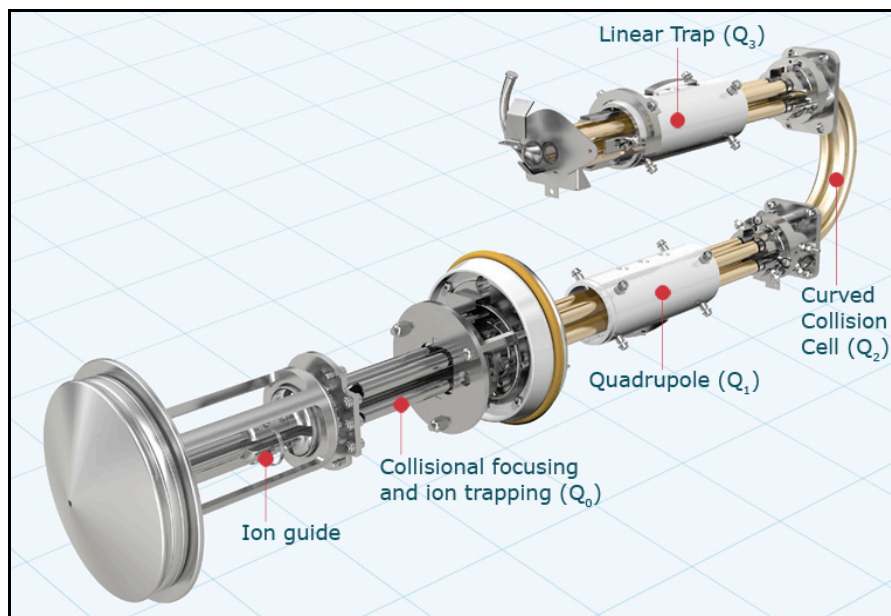


Figura 39. Esquema de los componentes de un equipo LC/MS/MS triple cuadrupolo

Para caracterizar el ion madre y los fragmentos de cada estándar, se inyectó una solución de 1 $\mu\text{g/mL}$, se ionizó la muestra y luego se determinaron los fragmentos que presentaron una mayor abundancia. Ya que la abundancia de los iones es mayor con una detección en modo negativo, al peso molecular de los estándares se le debe restar 1 g/mol. Así para el estándar de catequina, cuyo peso molecular es 290,28 g/mol, el ion madre presenta una relación masa/carga de 289 m/z. En la Figura 40 se observa el espectro completo de la infusión de catequina. A continuación se prosiguió a aislar el ion madre de la catequina, el cual se observa en la Figura 41. Al fragmentar este ion madre se obtienen fragmentos con diferentes abundancias. Una vez obtenidos estos fragmentos se seleccionan los fragmentos de mayor abundancia. Para la catequina estos fragmentos tenían una relación masa/carga de 109, 203 y 245 m/z. En la Figura 42 se observa el espectro de la fragmentación del ion madre de catequina y en la Figura 43 se observa el espectro aislado de los fragmentos seleccionados. Este mismo procedimiento se realizó para todos los estándares de polifenoles seleccionados (Anexo 3).

En la Tabla 14 se muestran los iones madre y los fragmentos obtenidos para cada estándar, junto con los potenciales característicos para cada fragmento (los potenciales permiten el ingreso por los diferentes tramos del equipo LC/MS/MS: Q0-Q1-Q2-Q3).

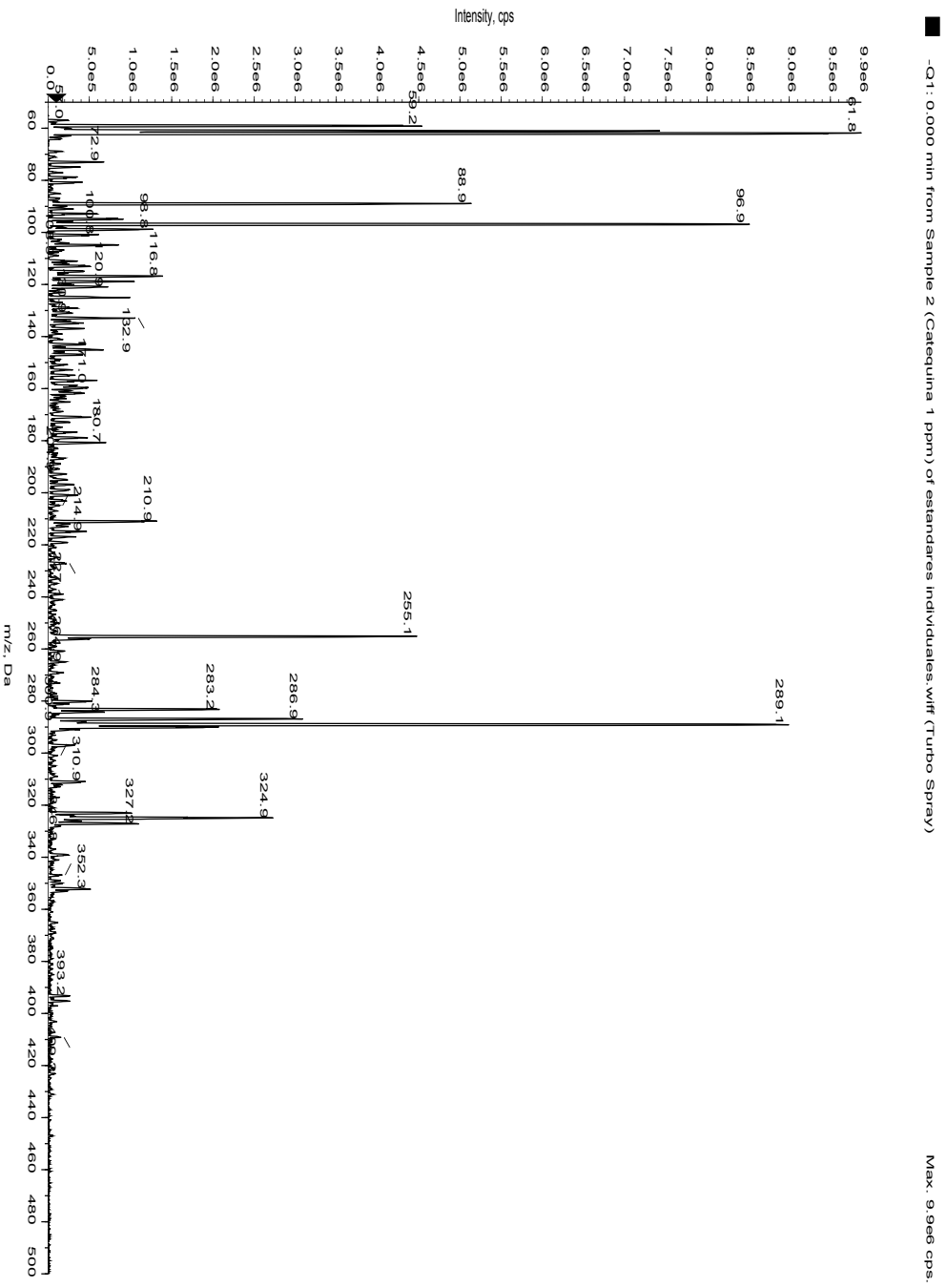


Figura 40. Espectro completo de la infusión de catequina 1 µg/mL. Se observa el ion madre con una relación carga/masa (m/z) de 289, que corresponde al peso molecular descrito para catequina menos 1 g/mol ya que se obtuvo esta lectura en modo negativo.

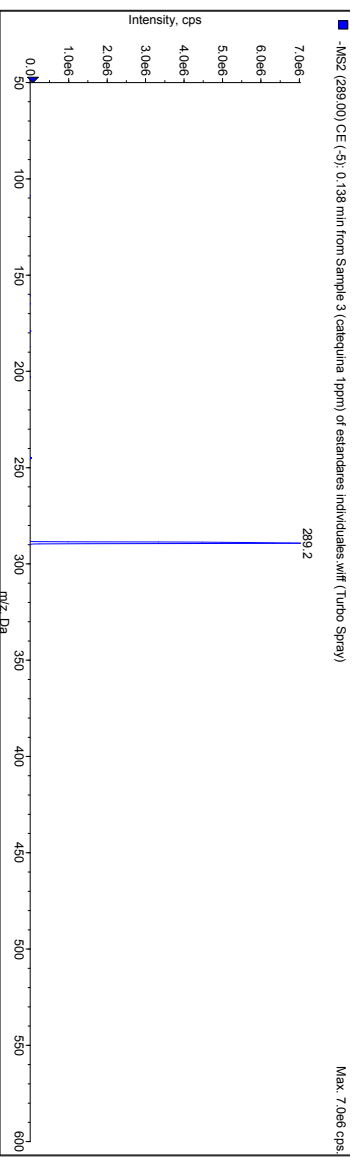


Figura 41. Espectro aislado del ion madre del estándar de catequina.

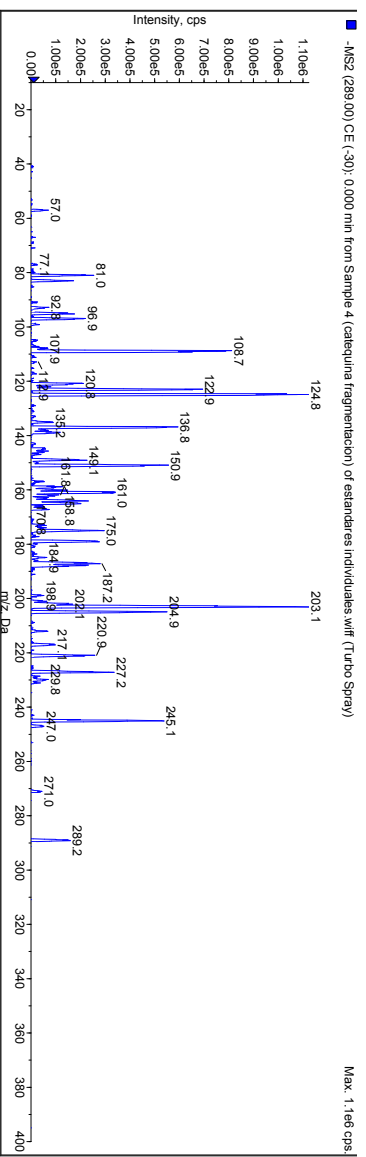


Figura 42. Espectro de la fragmentación del ion madre del estándar de catequina.

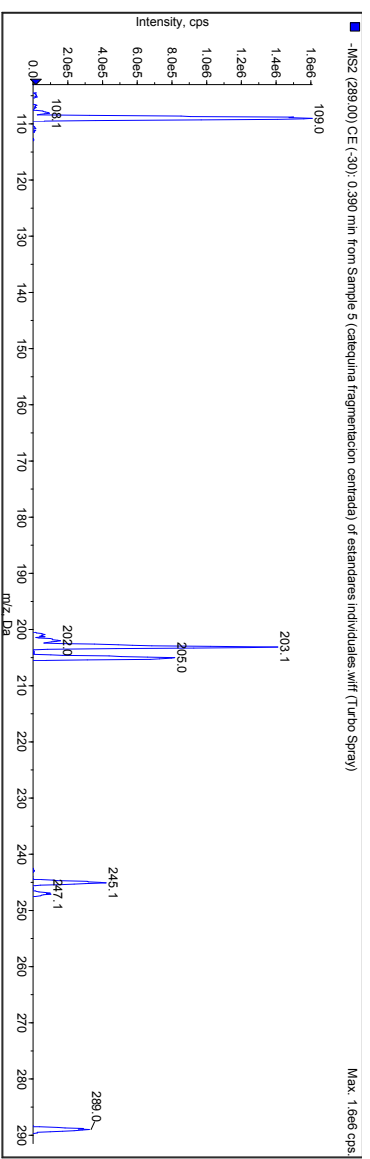


Figura 43. Espectro aislado de los fragmentos del estándar de catequina (109, 203 y 245).

Tabla 14. Iones madre, fragmentos y potenciales de los estándares de polifenoles determinados por espectrometría de masa

Identificación	Iones madre	Fragmentos		Potencial de des-agrupación (DP)	Potencial de entrada (EP)	Energía de colisión (CE)	Potencial de salida de la celda (CXP)
		m/z					
Catequina	289	109		-80	-7	-30	-19
		203		-80	-7	-25	-24
		245		-80	-7	-22,5	-13
Luteolina-7-glucósido	447	133		-37	-5	-72	-11
		285		-37	-5	-36	-30
		271		-100	-7	-68	-10
Rutina	609	300		-100	-7	-47	-38
		121		-27	-11	-38	-24
Quercetina	301	151		-27	-11	-32	-15
		179		-27	-11	-28	-10
		195		-6	-3	-35	-7
Baicaleína	269	223		-6	-3	-35	-25
		251		-6	-3	-30	-39
		211		-25	-7	-75	-7
Apigenina-7-glucósido	431	239		-25	-7	-63	-19
		268		-25	-7	-41	-25

m/z: relación masa/carga. DP: potencial que permite el ingreso a Q0. EP: potencial que permite el ingreso de Q0 a Q1. CE: energía que permite la fragmentación del ion precursor (Q2). CXP: potencial que permite el ingreso de Q3 al detector.

Obtenidas las condiciones optimizadas de los iones madre y de los fragmentos, se procedió a analizar los extractos herbales por el equipo LC/MS/MS acoplado a un equipo HPLC a través de una inyección por HPLC de los extractos de matico y llantén. Las condiciones cromatográficas para estos experimentos, se detallan en la Tabla 15.

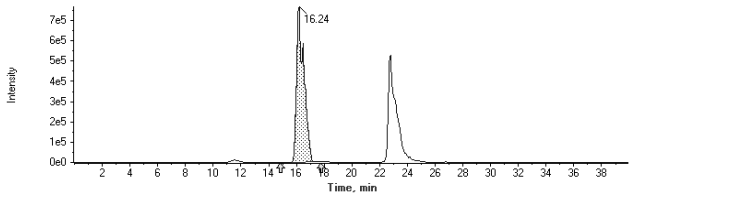
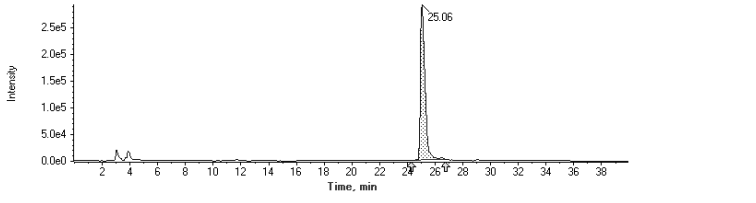
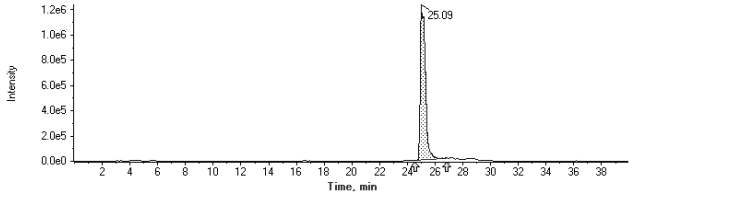
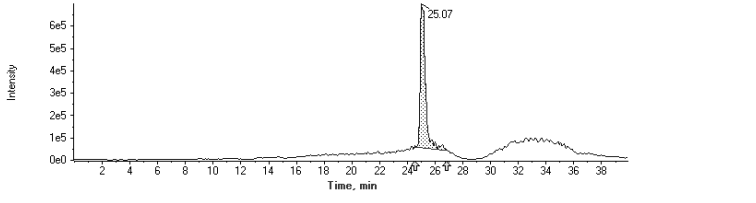
Tabla 15. Condiciones cromatográficas del equipo HPLC acoplado a LC/MS/MS

Parámetro	Especificaciones técnicas
Equipo	HPLC Masa con triple cuadrupolo (LC/MS/MS) Applied biosystems 5500
Columna	Purospher Star RP-18; 150 x 4.6 mm, 5 µm.
Fase Movil	Fase A= Agua: Ácido Acético (100:1) Fase B= Metanol: ACN: Ácido Acético (90:10:1)
Flujo	0,5 mL/min
Detección	Ionización modo negativo (Modo ESI -)
Volumen de inyección	10 µL
Temperatura del horno	30 °C
Parámetros de la fuente	
Ion source	Turbo spray
Curtain Gas (CUR)	10.0
Collision Gas (CAD)	8.0
Ion Spray voltaje (IS)	-3500.0
Temperatura (TEM)	650.0
Ion Source Gas 1 (GS1)	80.0
Ion Source Gas 2 (GS2)	20.0

Al analizar los cromatogramas obtenidos, se evidencia la presencia de los estándares de Luteolina-7-glucósido, Apigenina-7-glucósido, Rutina y Quercetina en el extracto de matico y los estándares de Luteolina-7-glucósido y Apigenina-7-glucósido en el extracto de llantén. En la Figura 44 se observan los cromatogramas de los iones seleccionados de los estándares de polifenoles, que se presentan en los extractos de matico y llantén.

Gracias a que los equipos de espectrometría de masa usan la relación masa/carga de los iones y no su concentración, pudimos observar la presencia de los estándares seleccionados presentes en los extractos de matico y llantén, a excepción del estándar de baicaleína, a pesar de que se describe en la literatura su presencia en el extracto de llantén (69).

Luteolina-7-glucósido (447/133)	
	Extracto de matico
	Extracto de llantén
Luteolina-7-glucósido (447/285)	
	Extracto de matico
	Extracto de llantén
Rutina (609/271)	
	Extracto de matico

Rutina (609/300)	
	Extracto de matico
Quercetina (301/121)	
	Extracto de matico
Quercetina (301/152)	
	Extracto de matico
Quercetina (301/179)	
	Extracto de matico

Apigenina-7-glucósido (431/211)	
	Extracto de matico
	Extracto de llantén
Apigenina-7-glucósido (431/239)	
	Extracto de matico
	Extracto de llantén

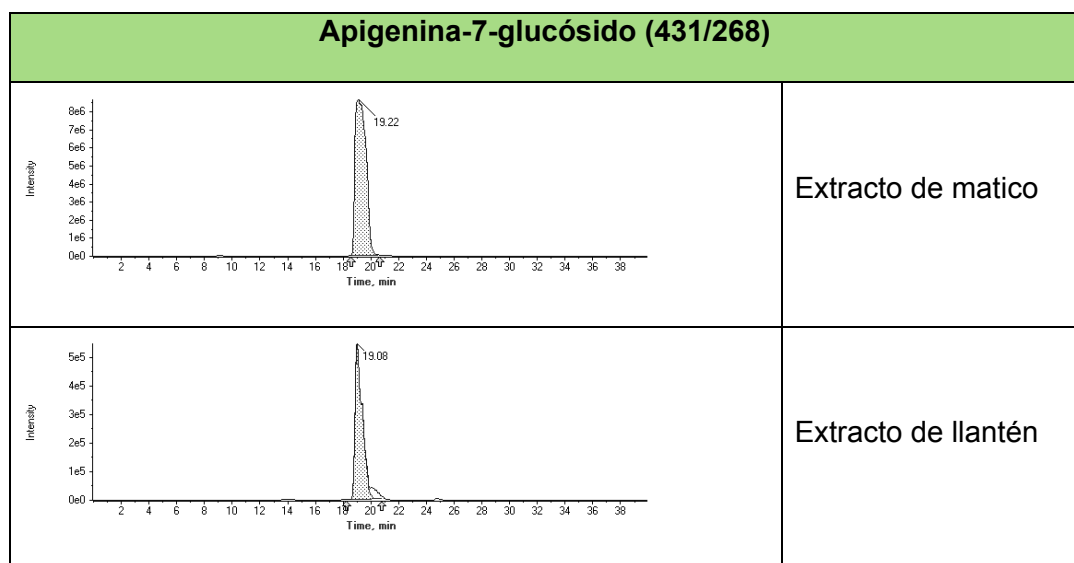


Figura 44. Cromatogramas LC/MS/MS de los iones seleccionados para cada estándar en los extractos de matico y llantén. Los números entre paréntesis ubicados en los títulos de cada espectro indican la relación masa/carga del ion madre con cada fragmento.

Parámetros de Semiología Clínica para evaluar Toxicidad de los extractos de matico y llantén

Se determinó la toxicidad aguda tras la administración oral de los extractos de matico y llantén a ratas Sprague-Dawley. Los parámetros testeados fueron:

- Aspecto: si el pelaje presenta un aspecto normal, en mal estado, con secreciones oculares y/o nasales o si presenta una postura anormal.
- Comportamiento espontáneo: si es normal, si presenta pequeños cambios, inactividad, automutilación, vocalización anormal, hiperactividad.
- Comportamiento en respuesta a la manipulación: si es normal, si presenta pequeños cambios, cambios moderados, agresividad o animal comatoso.
- Constantes vitales: si es normal, si hay cambios notorios en la temperatura corporal, frecuencia cardíaca o respiratoria.
- Mortalidad.

Al realizar el examen semiológico de las ratas controles y de las que recibieron el tratamiento con los extractos herbales, no se observaron diferencias significativas en ninguno de los parámetros medidos; lo que indica la no toxicidad de los extractos herbales bajo las condiciones establecidas.

5.5. CAPACIDAD REDUCTORA DE HIERRO Y CONCENTRACIÓN DE MALONDIALDEHÍDO EN PLASMA DE RATAS SPRAGUE-DAWLEY TRATADAS CON DIFERENTES DOSIS ORALES DE LOS EXTRACTOS DE MATICO Y LLANTÉN

En general se acepta que los efectos farmacológicos observados se relacionan con las concentraciones plasmáticas de un principio activo (46). Tratándose de fitofármacos que están constituidos por muchos principios activos, cuyas concentraciones individuales son muy bajas, la determinación de la concentración plasmática de alguno de ellos por los métodos actualmente disponibles, se hace muy difícil. De aquí que postulamos que medir efectos farmacológicos plasmáticos, sería una alternativa a la cuantificación de principios activos para la evaluación farmacocinética de fitofármacos. Se eligió a los antioxidantes, ya que ellos son abundantes especialmente en preparados herbales de sus hojas. Existen antecedentes que confirman la presencia no sólo de polifenoles en los extractos herbales, sino además, de compuestos tiólicos, los cuales son los antioxidantes no-enzimáticos mayoritarios de la célula animal (50). Estos compuestos podrían aumentar la capacidad antioxidante plasmática de animales tratados oralmente con el extracto de matico y llantén.

Cabe señalar que todas las patologías en mayor o menor grado, disminuyen la capacidad antioxidante celular, defensa necesaria para mantener la

homeostasis redox del organismo. Más aún, una disminución de la capacidad antioxidante puede conducir a estrés oxidativo, fenómeno estrechamente ligado a la baja del sistema inmune y a procesos inflamatorios, ambos fenómenos que también se asocian a todas las patologías (22, 64). Por lo tanto, la asociación de fitofármacos a terapias para enfermedades que cursen con estrés oxidativo importante, es válida proponerla para aumentar los agentes antioxidantes presentes en el organismo.

Como una forma de probar nuestro postulado, en esta tesis se midió la capacidad plasmática reductora de hierro y además, la concentración de malondialdehído plasmático, producto de la lipoperoxidación endógena. Para estas determinaciones se utilizaron alícuotas de las mismas muestras de plasma de las ratas utilizadas para la cuantificación de polifenoles plasmáticos por el método HPLC implementado.

Los rangos de tiempo ensayados fluctuaron entre 0 y 12 h post-administración oral de los extractos de matico y llantén. Los gráficos no consideran los valores en el intervalo de tiempo 0 y 2 h de tratamiento, debido a que en experimentos previos en este intervalo de tiempo no se observaron diferencias significativas entre los valores de los animales controles y tratados (datos no mostrados).

5.5.1. Efecto temporal de los extractos de matico y llantén sobre la capacidad plasmática reductora de hierro

El ensayo que determina la capacidad plasmática reductora de hierro (FRAP), mide los antioxidantes presentes en el plasma capaces de reducir el complejo Fe(III)-TPTZ a Fe(II)-TPTZ (Figuras 45, 46 y 47). Los resultados de este ensayo se muestran en las Figuras 45, 46 y 47, para el grupo control, para los grupos con el extracto de matico y llantén, respectivamente. En ellas se observa que la capacidad reductora plasmática de hierro efectivamente aumenta en los animales tratados con los extractos herbales, siendo este aumento menor para el llantén que para el matico. La diferencia del grupo matico A frente a su control fue aproximadamente 72 μ moles de hierro reducido/L de plasma a las 2 h de tratamiento, y la del grupo llantén A, aproximadamente 43 μ moles de hierro reducido/L de plasma a las 2 h. Esto no coincide con la diferencia en concentración de polifenoles y tioles, 3 veces mayor para matico que para llantén. Probablemente esto se deba a diferencias en las propiedades físicas de los antioxidantes presentes en ambos extractos. Al respecto y a diferencia de llantén, matico mostró un segundo máximo de capacidad reductora de hierro a las 10 h, indicando con ello una absorción más tardía de principios antioxidantes. Cabe señalar además, que a pesar de las diferencias en las dosis A y B ensayadas, no se observaron diferencias significativas en el aumento de la capacidad reductora de hierro plasmático ($p > 0.05$).

5.5.2. Efecto temporal de los extractos de matico y llantén sobre la concentración de malondialdehído plasmático

Otra forma de determinar la capacidad antioxidante celular, es determinar productos de desecho de las oxidaciones celulares. Como se mencionó anteriormente, el malondialdehído (MDA) es un producto de la oxidación de lípidos, por lo que a mayor capacidad antioxidante plasmática menor debería ser la concentración de este producto en el plasma. Los resultados de estas determinaciones para el grupo control y para los grupos con el extracto de matico y llantén se muestran en las Figuras 45, 46 y 47, respectivamente. Interesantemente, para las concentraciones de matico A y B el valor más bajo de MDA apareció a las 2 h. Esta disminución coincide con el máximo de capacidad reductora plasmática de hierro entre 2 y 4 h para matico (Figura 46). Similares resultados se obtuvieron con el extracto de llantén A y B; sin embargo, la dosis B mostró un aumento del valor basal a las 10 h, que coincide con la disminución del aumento de la capacidad reductora de hierro plasmático que a las 10 horas también alcanzó niveles basales (Figura 47).

La significancia de las diferencias observadas para la capacidad plasmática reductora de hierro y MDA plasmático aparecen en las Tablas 16 y 17, respectivamente. Cada uno de los valores de p de las Tablas 16 y 17, fueron calculados con respecto al grupo control, el cual fue analizado a las mismas horas de tratamiento de los animales con los extractos.

Se utilizó el test no pareado de Mann-Whitney para determinar el significado estadístico. En las Tablas 16 y 17 se visualiza mejor el tiempo de duración de los efectos antioxidantes medidos para cada extracto, ya que diferencias no significativas entre los valores basales controles y los aumentos (FRAP) o las disminuciones (MDA) anteriormente expuestas, significan término del efecto antioxidante provocado por los principios activos presentes en los extractos.

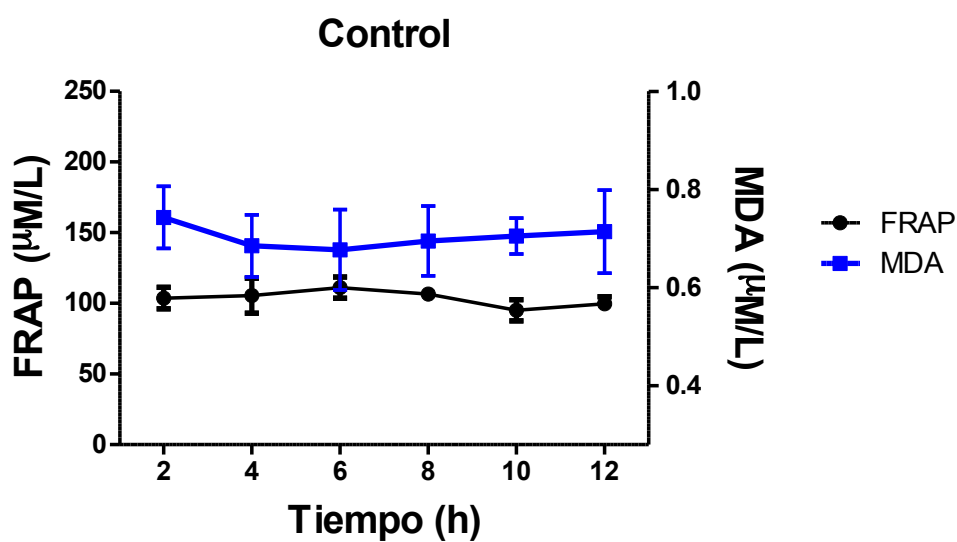


Figura 45. Capacidad plasmática reductora del hierro y MDA plasmático tras la administración oral de agua al grupo control. El volumen de agua administrado a las ratas del grupo control fue equivalente al de los extractos herbales (300 µL).

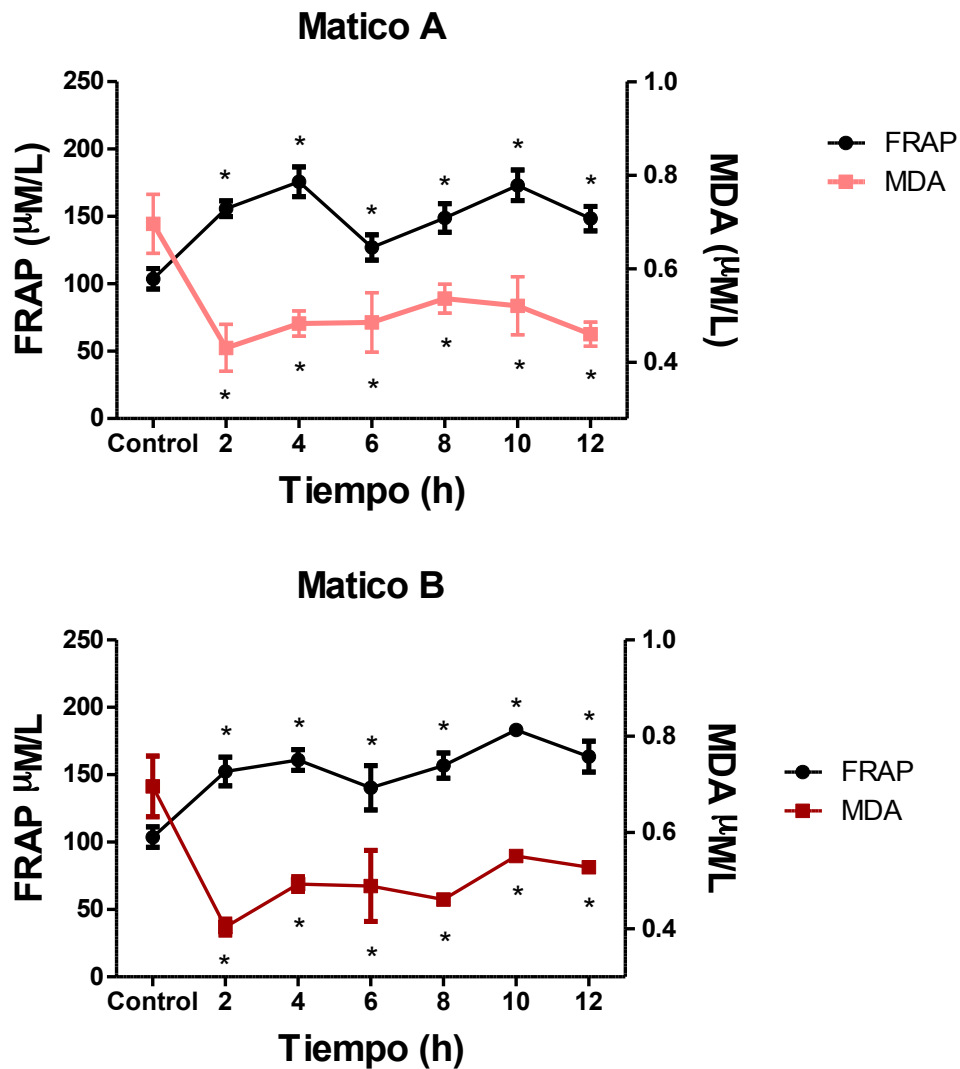


Figura 46. Capacidad plasmática reductora del hierro y MDA plasmático tras la administración oral del extracto de matico. Las dosis de matico A y B administradas fueron 0,546 y 5,46 mg equivalentes de catequina/Kg peso vivo, lo que equivale a 2,0 y 20,0 mg de extracto seco/Kg peso vivo, respectivamente. Cada valor representa el promedio de 3 animales por grupo ± DE. *: p<0,05.

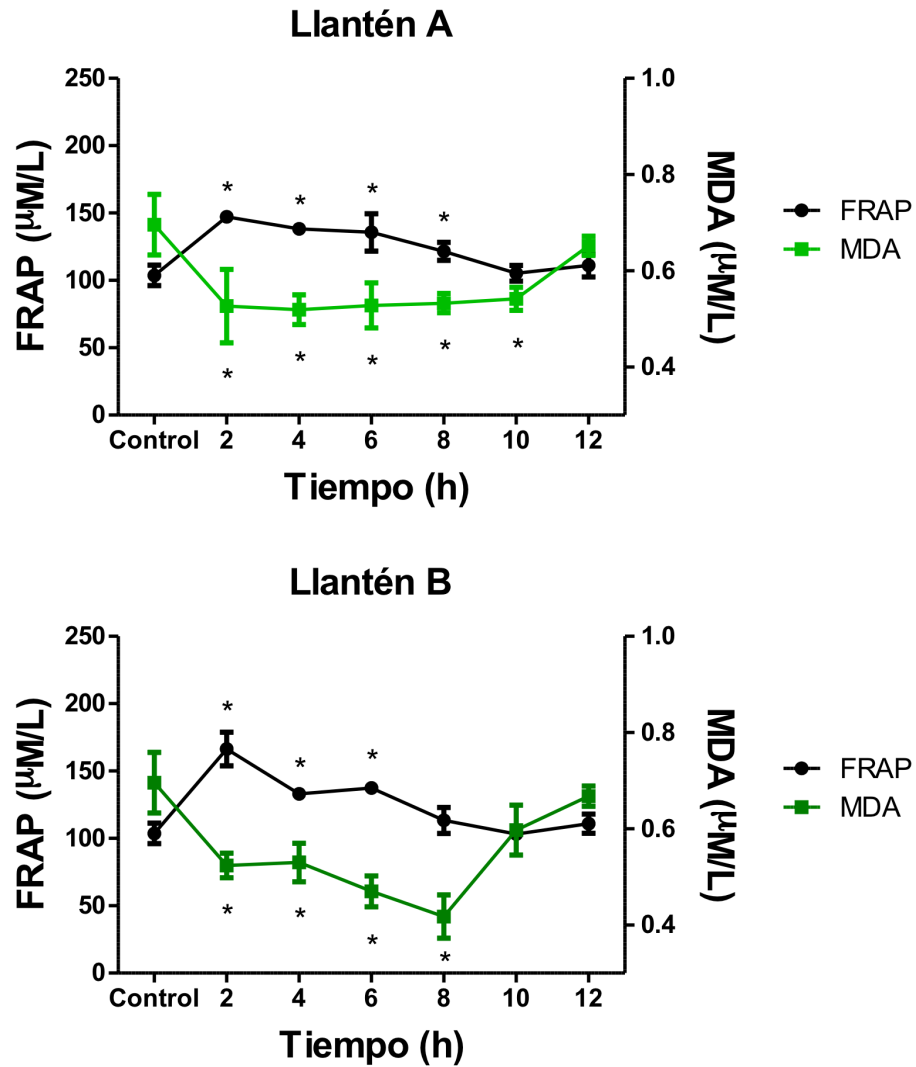


Figura 47. Capacidad plasmática reductora de hierro y MDA plasmático tras la administración oral del extracto de llantén. Las dosis de llantén A y B administradas fueron 0,546 y 2,73 mg equivalentes de catequina/Kg peso vivo, lo que equivale a 4,6 y 23,0 mg de extracto seco/Kg peso vivo, respectivamente. Cada valor representa el promedio de 3 animales por grupo \pm DE. *: $p < 0,05$.

TABLA 16. Significado estadístico de los valores de capacidad plasmática reductora de hierro

Tiempo (h)	Matico A	Matico B	Llantén A	Llantén B
2	0,0127	0,0127	0,0127	0,0127
4	0,0127	0,0127	0,0127	0,0127
6	0,0127	0,0127	0,0127	0,0127
8	0,0127	0,0127	0,0195	0,1611
10	0,0127	0,0127	0,7555	1,0
12	0,0127	0,0127	0,2129	0,2129

Los resultados representan los valores de p , los cuales fueron obtenidos utilizando el test no pareado de Mann-Whitney con respecto al grupo control. Cada valor representa el promedio de 3 animales por grupo. Intervalo de Confianza: 95%. $p > 0,05$ diferencias estadísticamente no significativas.

TABLA 17. Significado estadístico de los valores de concentración de malondialdehído plasmático

Tiempo (h)	Matico A	Matico B	Llantén A	Llantén B
2	0,0106	0,0106	0,0155	0,0106
4	0,0106	0,0106	0,0106	0,0105
6	0,0106	0,0155	0,0155	0,0106
8	0,0106	0,0105	0,0155	0,0106
10	0,0128	0,0105	0,0155	0,0596
12	0,0106	0,0105	0,2818	0,3815

Los resultados representan los valores de p , los cuales fueron obtenidos utilizando el test no pareado de Mann-Whitney con respecto al grupo control. Cada valor representa el promedio de 3 animales por grupo. Intervalo de Confianza: 95%. $p > 0,05$ diferencias estadísticamente no significativas.

6. DISCUSIÓN

A nivel mundial, el uso clínico de fitofármacos es escaso y la automedicación con preparados herbales no estandarizados, es lo que masivamente ocurre. A su vez, los preparados herbales comerciales de una misma planta, son muy variados; existiendo diferencias en la proveniencia de la planta (recolección o cultivo), parte de la planta utilizada (hojas, frutos, flores, etc.), procesos de extracción que utilizan diferentes condiciones, etc. Por otra parte, existen diferentes paradigmas pobremente explicados como son: “Los preparados naturales no son tóxicos” y “Las plantas medicinales curan todas las patologías”. Más aún, los estudios científicos acerca de la posología, seguridad y eficacia de los distintos preparados herbales son escasos. Por lo que a nuestro juicio, las falencias nombradas son las que impiden el uso clínico masivo de los fitofármacos.

La fitoterapia se apoya en diferentes postulados que pueden ser demostrados farmacológicamente. Muchos de estos postulados se relacionan con los principios activos involucrados en los mecanismos defensivos de las plantas, como por ejemplo sus compuestos antioxidantes y activadores del sistema inmune. Varios de los mecanismos defensivos de las plantas son similares a los de la célula animal, aunque la estructura química de los compuestos involucrados sea diferente. Asimismo, un análisis de las diferentes patologías

muestra que todas ellas, en mayor o menor grado, están asociados a estrés oxidativo, fenómeno estrechamente relacionado con la activación del sistema inmune y los procesos inflamatorios (Figura 47).

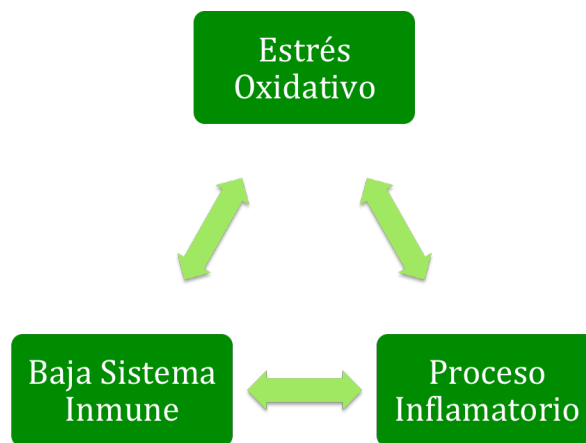


Figura 48. Diagrama del estrés oxidativo sobre el sistema inmune

La inflamación es un proceso fisiológico a través del cual se degradan oxidativamente estructuras celulares dañadas, para luego ser reemplazadas por otras funcionales. Este proceso es gatillado por diversas citoquinas, las que en general se activan por procesos redox que responden a EROs. Así, frente a un estrés oxidativo y para evitar el daño a biomoléculas, la célula activa factores de transcripción nuclear que conducen a la expresión de diferentes genes entre ellos factores de crecimiento, citoquinas inflamatorias, moléculas reguladoras del ciclo celular y enzimas antioxidantes.

Uno de estos ejemplos es lo que sucede en la señalización de proteínas quininas activadas por mitógenos (MAPK). Esta actividad gatillada por EROs, implica la activación de factores de transcripción nucleares. Estos factores controlan la expresión de genes protectores que reparan el ADN dañado, potencian el sistema inmune, detienen la proliferación de las células dañadas e inducen apoptosis. Por otra parte, el factor de transcripción nuclear NFκβ, está implicado en la respuesta inflamatoria y la proteína AP-1 es importante para el crecimiento y la diferenciación celular. Cabe señalar que P₅₃ es un gen cuya alteración está asociada con más de la mitad de todos los cánceres presentes en humanos, patología que se describe como una inflamación crónica irreversible. La proteína p53 protege un punto de control del ciclo celular y la inactivación de ella provoca la división celular descontrolada. El factor nuclear de células T activadas (NFAT) regula la formación de citoquinas, el crecimiento muscular y la diferenciación, la angiogénesis y la adipogénesis. Asimismo, el factor HIF-1 regula la expresión de muchos genes relacionados con el cáncer, incluyendo el factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF), enolasa, hemoxigenasa-1 y la lactato deshidrogenasa A (79). Estos antecedentes nos llevan a postular que preparados herbales que contienen principios activos antioxidantes-antiinflamatorios podrían constituir una buena estrategia terapéutica conducente a mejorar las defensas del organismo de los pacientes que enfrentan cualquier patología.

Es por ello que en esta tesis se postuló que los efectos antioxidantes plasmáticos provocados por fitofármacos, podrían ser utilizados como un marcador farmacológico a medir a través del tiempo, representando una nueva estrategia metodológica para evaluar parámetros farmacocinéticos de fitofármacos.

¿Puede ser reemplazada la metodología farmacocinética clásica que cuantifica concentración plasmática de un fármaco, por la cuantificación de algún efecto farmacológico medible en plasma? Para responder esta pregunta respecto de un fitofármaco, es necesario considerar los siguientes aspectos:

1. Un fitofármaco corresponde a un preparado herbal polivalente en principios activos (57).
2. Existen varios principios activos que desarrollan iguales efectos benéficos; sin embargo, no siempre el mecanismo a través del cual se ejercen dichos efectos, es el mismo. Esto explica el fenómeno de sinergismo descrito en nuestros resultados *in vitro* (9, 47, 48). Además, el sinergismo potencia el efecto benéfico individual de los principios activos.
3. Dado que pequeñas concentraciones de fitofármacos son farmacológicamente efectivas, el rango terapéutico es generalmente más amplio que el de los fármacos sintéticos. Esto determina que los fitofármacos sean más seguros o menos tóxicos.

¿Cuáles principios activos podrían ejercer efectos medibles en sangre? Deseando aumentar los mecanismos de defensa como estrategia terapéutica, se pensó en la cuantificación de antioxidantes. Las plantas poseen altas concentraciones de compuestos antioxidantes, entre ellos, compuestos fenólicos y azufrados. Estos compuestos son muy abundantes especialmente en las hojas, droga vegetal utilizada en la preparación de la mayoría de los fitofármacos como es el caso de los extractos herbales utilizados en este estudio. Cabe señalar que la capacidad antioxidante celular es una característica propia de todo tipo de células en el organismo, donde las células de la sangre no son la excepción. Esto debido a que los fenómenos redox son la base del catabolismo y el anabolismo celular.

En esta tesis se comparó la capacidad antioxidante *in vitro* de dos extractos hidro-alcohólicos estandarizados de *Buddleja globosa* Hope (matico) y *Plántago major* L. (llantén). Es importante destacar que aunque ambos extractos fueron preparados bajo las mismas condiciones, el extracto de matico desarrolló una capacidad antioxidante *in vitro* 3 veces mayor que la del extracto de llantén, esto demostrado por su capacidad de inhibir la lipoperoxidación (Figura 11 y Tabla 2) y la oxidación de tioles microsómicos de hígado de rata (Figura 12 y Tabla 2). Más aún, al mezclar ambos extractos, los efectos inhibitorios de esta mezcla sobre la lipoperoxidación fueron aditivos (Figura 14); sin embargo, los efectos inhibitorios sobre la oxidación de los

tioles microsómicos fueron sinérgicos (Figura 15). Esto corrobora lo anteriormente expuesto en relación a la diversidad de compuestos antioxidantes presentes en este tipo de preparados polivalentes, los que pueden incluso actuar sinérgicamente.

Entre los mecanismos a través de los cuales estos extractos desarrollarían la actividad antioxidante observada se pueden mencionar: a) el atrapamiento de radicales libres del oxígeno y b) la quelación de metales de transición. Al respecto, ambos extractos fueron capaces de quelar iones cúpricos, como se muestra por el cambio del espectro de absorbancia de estos iones en presencia de los extractos de matico y llantén (Figura 16).

Es importante mencionar que en los sistemas biológicos, los compuestos tiólicos son los agentes antioxidantes celulares más abundantes en los organismos animales, siendo el GSH, el principal y mayoritario. Como se mencionó en la introducción, ellos ejercen su actividad antioxidante a través de mecanismos similares a los polifenoles; sin embargo, los tioles presentan diferencias, ellos una vez oxidados, pueden ser re-reducidos por otros compuestos tiólicos, por lo tanto, pueden ser reutilizados (93, 94). Por otra parte, la actividad de diferentes proteínas es regulada por procesos redox que involucran la oxidación/reducción de sus grupos tiólicos. Así podemos mencionar la activación de factores de transcripción nuclear (MAPK) (79) y

regulación de actividades enzimáticas (GSH-transferasa, UDPG-glucuroniltransferasa) (36, 40, 79). En estas reacciones redox están involucradas tiorredoxinas, glutaredoxinas y GSH. De aquí nuestro interés de medir la actividad GSH transferásica en presencia de los extractos herbales. La forma activa de esta enzima es su dímero –S-S-. Por lo tanto, la presencia de compuestos capaces de reducir enlaces –S-S- a –SH debería inhibir la actividad conjugante de esta enzima (Tabla 5). A igualdad de concentración de tioles de los extractos herbales, la actividad de la GSH-transferasa microsómica fue inhibida en igual magnitud. Esta propiedad indicaría que estos extractos podrían además actuar *in vivo* en funciones regulatorias. Cabe mencionar, que antioxidantes tales como ditioneol, N-acetil-cisteína y cisteína mostraron una capacidad inhibitoria de la actividad GSH-transferásica aproximadamente 100 veces menor a la de los extractos en estudio (Tabla 5). Los IC₅₀ de los extractos herbales están en el rango de concentración nM y los de los compuestos purificados, en orden μM. Estos resultados avalan los resultados obtenidos en la reversión de la oxidación de los tioles microsómicos y nuevamente apoyan nuestro postulado en relación a que la variedad de compuestos antioxidantes presentes en los extractos, les permite desarrollar en este caso, su actividad antioxidante de forma sinérgica (29).

Para medir parámetros farmacocinéticos como la biodisponibilidad, normalmente se utilizan métodos clásicos HPLC. Es por esto que previo a

evaluar la capacidad antioxidante plasmática, se implementó un método HPLC para cuantificar polifenoles en el plasma de las ratas tratadas con los extractos herbales. Para ello se utilizaron muestras de plasma cargados con los estándares rutina, quercetina, baicaleína, luteolina-7-glucósido y apigenina-7-glucósido. Las dosis administradas fueron extrapoladas de un estudio clínico realizado por nuestro Laboratorio con un extracto de matico (manuscrito en revisión), el cual demostró actividad farmacológica con las dosis utilizadas. Desafortunadamente, los cromatogramas obtenidos de las muestras de plasma de las ratas que recibieron dicha dosis y una 10 veces mayor, sólo mostraron el pico correspondiente a la catequina, polifenol utilizado como estándar interno (Figuras 36, 37 y 38).

La no aparición de picos en los cromatogramas del plasma de ratas tratadas, podría deberse a:

- 1) La ausencia de los marcadores en los extractos en estudio.
- 2) La dosis administrada. Aunque se demostró su eficacia terapéutica, fue muy baja para poder observar concentraciones medibles en plasma por el método HPLC. Existen publicaciones que utilizan dosis excesivamente altas para poder obtener resultados positivos en plasma; sin embargo, estos estudios no consideran los potenciales efectos tóxicos de dichas dosis (47, 88).

- 3) La baja concentración de cada uno de los polifenoles presentes en los extractos en estudio, los cuales no pudieron ser detectados por el equipo HPLC con arreglo de diodo utilizado.
- 4) La biodisponibilidad de polifenoles administrada. Según la literatura, la biodisponibilidad por vía oral fluctúa entre un 15 a un 60% (46, 56, 62, 71, 95), dependiendo tanto de factores fisiológicos como del extracto administrado. Los polifenoles en el tracto gastrointestinal se pueden absorber y pasar a la circulación sistémica, o tener un efecto local. Los que llegan a la sangre, se pueden metabolizar originando metabolitos con una estructura química diferente a la molécula original.

Si bien no se pudo desarrollar una tecnología HPLC para determinar parámetros farmacocinéticos y biodisponibilidad de nuestros extractos utilizados en ratas, este trabajo deja un set de tecnología para medir polifenoles como marcadores de extractos herbales; ya que el perfil cromatográfico de los polifenoles del extracto de matico fue diferente al del extracto de llantén. Estos perfiles cromatográficos podrían también ser utilizados para investigar la calidad de los antioxidantes presentes en extractos de diferente origen, determinando la homogeneidad de diferentes lotes de producción y así la uniformidad de los productos finales.

Los marcadores polifenólicos utilizados para implementar el Método HPLC están descritos en la literatura y por tanto, como una forma de detectar su presencia en los extractos herbales se decidió analizar dichos extractos en un equipo HPLC acoplado a un espectrómetro de masa (LC/MS/MS), metodología de mayor sensibilidad que el HPLC. A través de este estudio se pudo corroborar la presencia de los estándares seleccionados en los extractos de matico y llantén. Esto demuestra la baja concentración de los principios activos en los extractos herbales, aunque en nuestro caso se trata de compuestos polifenólicos que son los mayoritarios especialmente en las hojas de las plantas medicinales.

Respecto de la capacidad antioxidante plasmática de los animales tratados, observamos que la capacidad plasmática reductora de hierro aumentó (Figuras 46 y 47). Sin embargo, aunque se les administró la misma concentración de polifenoles a los animales tratados con matico y llantén (0,546 mg equivalentes de catequina/Kg peso vivo), el grupo matico presentó una mayor actividad reductora de hierro plasmático que el grupo llantén. Esto indicaría que no sólo los polifenoles y tioles estarían involucrados en esta actividad antioxidante plasmática, sino que también otros compuestos antioxidantes, como por ejemplo aminas orgánicas, las cuales aportarían a la capacidad antioxidante plasmática.

Cabe señalar además que el aumento temporal observado en el plasma de ratas tratadas con mático, mostró la aparición de dos picos máximos. El llantén en cambio, mostró sólo un pico temprano (Figura 46 y 47). Esto podría deberse a diferencias en la solubilidad del conjunto de compuestos antioxidantes presentes en ambos extractos. Los compuestos liposolubles se absorben más rápidamente que los polares. Por lo tanto, el extracto de matico podría contener antioxidantes liposolubles que corresponderían a su acción antioxidante que originó el primer pico y otros más polares que evidenciarían su acción a través del segundo pico observado. El único pico del llantén aparecido tempranamente, indicaría que el conjunto de compuestos antioxidantes de este extracto tendrían un carácter lipofílico. Para ambos extractos se han descrito propiedades antiinflamatorias (4, 6, 7, 43, 80); sin embargo, al matico se le asignan principalmente propiedades cicatrizantes de heridas de la piel y gastrointestinales. El llantén en cambio, se utiliza como hepato-protector, lo cual requiere la absorción de sus principios activos (53). Estos efectos terapéuticos concuerdan con nuestros resultados; los principios activos responsables de los efectos cicatrizantes del matico corresponderían principalmente al segundo pico de aumento de la capacidad antioxidante plasmática, debido a una mayor dificultad de absorción de ellos. Asimismo, el pico temprano (2 h) aparecido tanto en el extracto de matico como el de llantén sería responsable de los efectos sistémicos descritos para extractos de hojas

de estas plantas y corresponderían a los principios activos liposolubles, de absorción más rápida (71).

Consecuente con el aumento de la capacidad antioxidante plasmática, la concentración de MDA plasmático disminuyó (Figuras 46 y 47), fenómeno que fue cuantitativamente mayor en las ratas tratadas con matico que con llantén. Es importante mencionar que el aumento de la capacidad antioxidante plasmática observada no involucra la inducción de enzimas antioxidantes. En nuestros experimentos, este último fenómeno no puede ser considerado debido al tiempo máximo de medición evaluado, que fue de 12 horas después de administrado el extracto. La visualización de los efectos de la inducción enzimática requiere al menos de 24 horas de tratamiento.

Lamentablemente, no se observó correlación entre las dosis administradas a las ratas y la capacidad antioxidante plasmática. Probablemente estos resultados se relacionan con las bajas dosis administradas y concuerdan con la no aparición de los picos de los estándares en las muestras de plasma de las ratas tratadas. Las dosis descritas en la literatura para este tipo de investigaciones se distribuyen en un rango muy amplio y muy superiores a las dosis utilizadas en este estudio (8).

Resumiendo podemos decir que:

1. Ambos extractos presentaron actividad antioxidante *in vitro* y aumentaron la capacidad antioxidante plasmática de ratas tratadas oralmente con los extractos de matico y llantén.
2. El efecto farmacológico antioxidante plasmático no se pudo correlacionar con la concentración plasmática de los polifenoles medidos por el método HPLC previamente implementado.
3. A igualdad de dosis (igual concentración de polifenoles y tioles), el efecto antioxidante plasmático del grupo matico fue 3 veces superior a la del grupo llantén.
4. No se observó correlación entre las dosis administradas a las ratas y la capacidad antioxidante plasmática. Las dosis menores ensayadas de los extractos fueron extrapoladas de datos de nuestro laboratorio obtenidos de estudios clínicos previos, que demostraron la eficacia y seguridad de las dosis administradas.
5. Si bien el método HPLC implementado no permitió determinar la concentración plasmática de polifenoles presentes en cada uno de los extractos, este método podría ser utilizado para determinar el perfil cromatográfico de distintos lotes de un preparado herbal estandarizado. Más aún, este análisis cromatográfico sumado a la cuantificación de los marcadores específicos actualmente establecidos, entregarían una caracterización más confiable de los preparados herbales.

Este trabajo es el primer estudio que pretende evaluar características farmacocinéticas de fitofármacos (extractos polivalentes). Es importante resaltar que aunque no observamos correlaciones dosis-respuesta, el efecto antioxidante de los extractos si fue medible en el plasma de las ratas tratadas. Es por ello que nuevos estudios están en desarrollo para confirmar los hallazgos encontrados en este trabajo. La implementación de metodologías que nos permitan evaluar parámetros farmacocinéticos, permitiría que los fitofármacos cumplan con mayores estándares farmacocinéticos facilitando su uso en atención primaria de salud.

7. CONCLUSIONES

- Los métodos ensayados *in vitro* nos permitieron tener una primera caracterización de los preparados herbales, en base a sus principales componentes antioxidantes, polifenoles y tioles, con acción farmacológica.
- La metodología HPLC implementada nos permitió obtener el perfil cromatográfico de ambos preparados y compararlos entre sí.
- La capacidad antioxidante plasmática nos permitió caracterizar el efecto farmacológico *in vivo* de los preparados.

Consideramos que este trabajo, a pesar de ser el primer intento para asemejar la evaluación de fármacos sintéticos a un fitofármaco (polivalente), abre posibilidades de obtener metodologías que permitan controlar la eficacia y seguridad de los fitofármacos. La diversidad de preparados comerciales provenientes de una misma especie vegetal hace necesario esta implementación metodológica. Ello permitiría no sólo obtener lotes homogéneos, sino además estar seguros de la eficacia de los mismos, ayudando así al uso masivo de fitofármacos, especialmente en nuestra Atención Primaria de Salud.

8. BIBLIOGRAFÍA

1. Aniya Y, Naito A. 1993. Oxidative stress-induced activation of microsomal glutathione s-transferase in isolated rat liver. *Biochem. Pharmacol.* 45(1):37–42
2. Aruoma OI. 2003. Methodological considerations for characterizing potential antioxidant actions of bioactive components in plant foods. *Mutat. Res. Mol. Mech. Mutagen.* 523-524:9–20
3. Azmi AS, Bhat SH, Hanif S, Hadi SM. 2006. Plant polyphenols mobilize endogenous copper in human peripheral lymphocytes leading to oxidative dna breakage: a putative mechanism for anticancer properties. *FEBS Lett.* 580(2):533–38
4. Backhouse N, Rosales L, Apablaza C, Goity L, Erazo S, et al. 2008. Analgesic, anti-inflammatory and antioxidant properties of *buddleja globosa*, buddlejaceae. *J. Ethnopharmacol.* 116(2):263–69
5. Barnham KJ, Bush AI. 2008. Metals in alzheimer's and parkinson's diseases. *Curr. Opin. Chem. Biol.* 12(2):222–28
6. Beara IN, Lesjak MM, Jovin ED, Balog KJ, Anackov GT, et al. 2009. Plantain (*plantago l.*) species as novel sources of flavonoid antioxidants. *J. Agric. Food Chem.* 57(19):9268–73
7. Beara IN, Orčić DZ, Lesjak MM, Mimica-Dukić NM, Peković BA, Popović MR. 2010. Liquid chromatography/tandem mass spectrometry study of anti-inflammatory activity of plantain (*plantago l.*) species. *J. Pharm. Biomed. Anal.* 52(5):701–6
8. Bell JR, Donovan JL, Wong R, Waterhouse a L, German JB, et al. 2000. (+)-catechin in human plasma after ingestion of a single serving of reconstituted red wine. *Am. J. Clin. Nutr.* 71(1):103–8
9. Benzie IF, Strain JJ. 1996. The ferric reducing ability of plasma (frap) as a measure of “antioxidant power”: the frap assay. *Anal. Biochem.* 239(1):70–76
10. Borne FP, Miranda JB. 2009. *Farmacopea Chilena*. 393 pp. Impr. Barc ed.
11. Bruneton J. 2001. *Farmacognosia Fitoquímica Plantas Medicinales*. Second Edi ed.
12. Bull LS, Pitts GC. 1971. Gastric capacity and energy absorption in the force-fed rat. *J. Nutr.* 101:593–96
13. Calixto JB. 2005. Twenty-five years of research on medicinal plants in latin america: a personal view. *J. Ethnopharmacol.* 100(1-2):131–34

14. Chiang LC, Chiang W, Chang MY, Ng LT, Lin CC. 2002. Antiviral activity of plantago major extracts and related compounds in vitro. *Antiviral Res.* 55(1):53–62
15. D'Archivio M, Filesi C, Vari R, Scazzocchio B, Masella R. 2010. Bioavailability of the polyphenols: status and controversies. *Int. J. Mol. Sci.* 11(4):1321–42
16. Del Rio D, Costa LG, Lean MEJ, Crozier a. 2010. Polyphenols and health: what compounds are involved? *Nutr. Metab. Cardiovasc. Dis.* 20(1):1–6
17. Espín JC, García-Conesa MT, Tomás-Barberán FA. 2007. Nutraceuticals: facts and fiction. *Phytochemistry.* 68(22-24):2986–3008
18. European Medicines Agency. 2012. Guideline on bioanalytical method validation
19. Fraga CG, Galleano M, Verstraeten S V, Oteiza PI. 2010. Basic biochemical mechanisms behind the health benefits of polyphenols. *Mol. Aspects Med.* 31:435–45
20. Gaertner DJ, Hallman TM, Hankenson FC, Batchelder MA. 2008. Anesthesia and analgesia for laboratory rodents. In *Anesthesia and Analgesia in Laboratory Animals*, pp. 239–97. Elsevier Inc. Second ed.
21. Gan SH, Ismail R, Wan Adnan W a, Wan Z. 2002. Method development and validation of a high-performance liquid chromatographic method for tramadol in human plasma using liquid-liquid extraction. *J. Chromatogr. B.* 772(1):123–29
22. Halliwell B. 1994. Free radicals, antioxidants, and human disease: curiosity, cause, or consequence? *Lancet.* 344(8924):721–24
23. Halliwell B, Rafter J, Jenner A. 2005. Health promotion by flavonoids , tocopherols , tocotrienols , and other phenols : direct or indirect effects ? antioxidant or not ? 1 – 4. *Am. J. Clin. Nutr.* 81:268–76
24. Hoffmann A, Farga C, Lastra J, Veghazi E. 1992. *Plantas Medicinales de Uso Común en Chile*. II Edición ed.
25. Houghton PJ, Hylands PJ, Mensah AY, Hensel A, Deters AM. 2005. In vitro tests and ethnopharmacological investigations: wound healing as an example. *J. Ethnopharmacol.* 100(1-2):100–107
26. Houghton PJ, Mensah AY. 1999. Biologically active compounds from buddleja species. In *Human health protection, nutrition, and plant defense: Recent Advances in Phytochemistry: Phytochemicals.*, ed R Jonh T. 33:343–68. New York
27. Janković T, Zdunić G, Beara I, Balog K, Pljevljakušić D, et al. 2012. Comparative study of some polyphenols in plantago species. *Biochem. Syst. Ecol.* 42:69–74

28. Jones DP. 2008. Radical-free biology of oxidative stress. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* 295(C):849–68
29. Jones DP. 2008. Radical-free biology of oxidative stress. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* 295(4):C849–68
30. Kell DB. 2009. Iron behaving badly: inappropriate iron chelation as a major contributor to the aetiology of vascular and other progressive inflammatory and degenerative diseases. *BMC Med. Genomics.* 2:1–79
31. Kontogianni VG. 2014. Novel techniques towards the identification of different classes of polyphenols. In *Polyphenols in Plants*, pp. 159–85. Elsevier Inc.
32. Kris-etherton PM, Hecker KD, Bonanome A, Coval SM, Binkoski AE, et al. 2002. Bioactive compounds in foods: their role in the prevention of cardiovascular disease and cancer. *Am. J. Med.* 113(9B):71S – 88S
33. Laboratories H. Harlan. http://www.harlan.com/products_and_services/research_models_and_services/research_models/sprague_dawley_outbred_rat.html
34. Letelier ME, Cortes JF, Lepe AM, Jara JA, Molina-berríos A, et al. 2009. Evaluation of the antioxidant properties and effects on the biotransformation of commercial herbal preparations using rat liver endoplasmic reticulum. *Boletín Latinoam. y del Caribe Plantas Med. y Aromáticas.* 8(2):110–20
35. Letelier ME, Del Villar E, Sanchez E. 1985. Drug tolerance and detoxicating enzymes in octodon degus and wistar rats. comparative study. *Comp. Biochem. Physiol. Part C Comp. Pharmacol.* 80(1):195–98
36. Letelier ME, Lagos F, Faúndez M, Miranda D, Montoya M, et al. 2007. Copper modifies liver microsomal udp-glucuronyltransferase activity through different and opposite mechanisms. *Chem. Biol. Interact.* 167(1):1–11
37. Letelier ME, Lepe AM, Faúndez M, Salazar J, Marín R, et al. 2005. Possible mechanisms underlying copper-induced damage in biological membranes leading to cellular toxicity. *Chem. Biol. Interact.* 151(2):71–82
38. Letelier ME, Martínez M, González-Lira V, Faúndez M, Aracena-Parks P. 2006. Inhibition of cytosolic glutathione s-transferase activity from rat liver by copper. *Chem. Biol. Interact.* 164(1-2):39–48
39. Letelier ME, Molina-Berríos A, Cortés-Troncoso J, Jara-Sandoval J, Müller A, Aracena-Parks P. 2010. Comparative effects of superoxide anion and hydrogen peroxide on microsomal and cytosolic glutathione s-transferase activities of rat liver. *Biol. Trace Elem. Res.* 134(2):203–11

40. Letelier ME, Pimentel A, Pino P, Lepe AM, Faúndez M, et al. 2005. Microsomal udp-glucuronyltransferase in rat liver: oxidative activation. *Basic Clin. Pharmacol. Toxicol.* 96(6):480–86
41. Letelier ME, Rodríguez-Rojas C, Sánchez-Jofré S, Aracena-Parks P. 2011. Surfactant and antioxidant properties of an extract from chenopodium quinoa wild seed coats. *J. Cereal Sci.* 53(2):239–43
42. Letelier ME, Terán A, Barra MA, Aracena-Parks P. 2009. Antioxidant properties of rosmarinus officinalis and its effects on xenobiotic biotransformation. *Boletín Latinoam. y del Caribe Plantas Med. y Aromáticas.* 8(6):487–97
43. Liao YH, Houghton PJ, Hoult JR. 1999. Novel and known constituents from buddleja species and their activity against leukocyte eicosanoid generation. *J. Nat. Prod.* 62(9):1241–45
44. Lowry OH, Rosenrough NJ, Farr AL, Randall RJ. 1951. Protein measurement with the folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 193:265–75
45. Lwanga SK, Lemeshow S. 1991. Sample size determination in health studies
46. Manach C, Scalbert A, Morand C, Rémésy C, Jiménez L. 2004. Polyphenols: food sources and bioavailability. *Am. J. Clin. Nutr.* 79(5):727–47
47. Manach C, Williamson G, Morand C, Scalbert A, Rémésy C. 2005. Bioavailability and bioefficacy of polyphenols in humans. i. review of 97 bioavailability studies. *Am. J. Clin. Nutr.* 81(1 Suppl):230S – 242S
48. Marston A. 2007. Role of advances in chromatographic techniques in phytochemistry. *Phytochemistry.* 68(22-24):2786–98
49. Martins S, Mussatto SI, Martínez-Avila G, Montañez-Saenz J, Aguilar CN, Teixeira JA. 2011. Bioactive phenolic compounds: production and extraction by solid-state fermentation. a review. *Biotechnol. Adv.* 29(3):365–73
50. Masella R, Mazza G. 2009. *Glutathione and Sulfur Amino Acids in Human Health and Disease.* Hoboken, NJ, USA: John Wiley & Sons, Inc. 626 pp.
51. Mensah AY, Houghton PJ, Bloomfield S, Vlietinck A, Vandem Berghe D. 2000. Known and novel terpenes from buddleja globosa displaying selective antifungal activity against dermatophytes. *J. Nat. Prod.* 63(9):1210–13
52. Mensah AY, Sampson J, Houghton PJ, Hylands PJ, Westbrook J, et al. 2001. Effects of buddleja globosa leaf and its constituents relevant to wound healing. *J. Ethnopharmacol.* 77(2-3):219–26

53. Molares S, Ladio A. 2009. Chemosensory perception and medicinal plants for digestive ailments in a mapuche community in nw patagonia, argentina. *J. Ethnopharmacol.* 123(3):397–406
54. Montrichard F, Alkhaloui F, Yano H, Vensel WH, Hurkman WJ, Buchanan BB. 2009. Thioredoxin targets in plants: the first 30 years. *J. Proteomics.* 72(3):452–74
55. Navas LE. 1979. *Flora de la Cuenca de Santiago de Chile*. Santiago, Chile. Tomo III p. Ediciones ed.
56. Neilson A, Ferruzzi M. 2012. Bioavailability and metabolism of bioactive compounds from foods. ... *Prev. Treat.* ..., pp. 407–23
57. Pablo J, Montecinos M. 2009. Plantas medicinales , fitofármacos y fitomedicamentos : hacia una fitomedicina (fitoterapia moderna y racional), basada en la evidencia científica. In *Plantas medicinales y Medicina natural.*, pp. 1–7. 2° edición ed.
58. Pardo F, Perich F, Torres R. 1997. Un nuevo glicosido de buddleja globosa con actividad bactericida. *Boletín la Soc. Chil. Química.* 42:101–4
59. Pardo F, Perich F, Villarroel L, Torres R. 1993. Isolation of verbascoside, an antimicrobial constituent of buddleja globosa leaves. *J. Ethnopharmacol.* 39(3):221–22
60. Patwardhan B, Mashelkar RA. 2009. Traditional medicine-inspired approaches to drug discovery: can ayurveda show the way forward? *Drug Discov. Today.* 14(15-16):804–11
61. Pignatelli P, Ghiselli a, Buchetti B, Carnevale R, Natella F, et al. 2006. Polyphenols synergistically inhibit oxidative stress in subjects given red and white wine. *Atherosclerosis.* 188(1):77–83
62. Quideau S, Deffieux D, Douat-Casassus C, Pouységu L. 2011. Plant polyphenols: chemical properties, biological activities, and synthesis. In *Angewandte Chemie International Edition.* 50(3):586–621
63. Quideau S, Deffieux D, Douat-casassus C, Pouysøgu L. 2011. Natural products plant polyphenols : chemical properties , biological activities , and synthesis ** angewandte
64. Reuter S, Gupta SC, Chaturvedi MM, Aggarwal BB. 2010. Oxidative stress, inflammation, and cancer: how are they linked? *Free Radic. Biol. Med.* 49(11):1603–16
65. Rodrigo R, Castillo R, Carrasco R, Huerta P, Moreno M. 2005. Diminution of tissue lipid peroxidation in rats is related to the in vitro antioxidant capacity of wine. *Life Sci.* 76(8):889–900

66. Rodrigo R, Miranda A, Vergara L. 2010. Modulation of endogenous antioxidant system by wine polyphenols in human disease. *Clin. Chim. Acta.* 412(5-6):410–24
67. Rodrigo R, Rivera G. 2002. Renal damage mediated by oxidative stress: a hypothesis of protective effects of red wine. *Free Radic. Biol. Med.* 33(3):409–22
68. Sabu MC, Smitha K, Kuttan R. 2002. Anti-diabetic activity of green tea polyphenols and their role in reducing oxidative stress in experimental diabetes. *J. Ethnopharmacol.* 83(1-2):109–16
69. Samuelsen AB. 2000. The traditional uses, chemical constituents and biological activities of plantago major L. a review. *J. Ethnopharmacol.* 71(1-2):1–21
70. Saura-Calixto F, Serrano J, Goni I. 2007. Intake and bioaccessibility of total polyphenols in a whole diet. *Food Chem.* 101(2):492–501
71. Scalbert A, Williamson G. 2000. Dietary intake and bioavailability of polyphenols. *J. Nutr.* 130:2073–85
72. Sies H. 2010. Polyphenols and health : update and perspectives. *Arch. Biochem. Biophys.* 501:2–5
73. Skoog DA. 2001. *Principios de análisis instrumental*. Madrid: McGraw-Hill/Interamericana de España, Madrid. 1028 pp. 5a. Ed. ed.
74. Tallarida RJ. 2001. Drug synergism: its detection and applications. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 298(3):865–72
75. Tapiero H, Tew KD, Ba GN, Mathé G. 2002. Polyphenols: do they play a role in the prevention of human pathologies? *Biomed. Pharmacother.* 56(4):200–207
76. U.S. Department of Health and Human Services, Food and Drug Administration, Center for Drug Evaluation and Research (CDER) C for VM (CVM). 2001. Guidance for industry. bioanalytical method validation.
77. Ulrich-Merzenich G, Panek D, Zeitler H, Vetter H, Wagner H. 2010. Drug development from natural products: exploiting synergistic effects. *Indian J. Exp. Biol.* 48(3):208–19
78. Umscheid CA, Margolis DJ, Grossman CE. 2012. Key concepts of clinical trials: a narrative review. *NIH Public Access.* 29(6):997–1003
79. Valko M, Rhodes CJ, Moncol J, Izakovic M, Mazur M. 2006. Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer. *Chem. Biol. Interact.* 160(1):1–40

80. Velasco-Lezama R, Tapia-Aguilar R, Román-Ramos R, Vega-Avila E, Pérez-Gutiérrez MS. 2006. Effect of plantago major on cell proliferation in vitro. *J. Ethnopharmacol.* 103(1):36–42
81. Vogel H, Jeldres P, Razmilic I, Doll U. 2010. Morphological characters, yields and active principles in wild and cultivated accessions of the chilean medicinal plant buddleja globosa hope. *Ind. Crops Prod.*
82. Vogel H, Razmilic Bonilla I, Polanco González X, Letelier Muñoz ME. 2010. Effect of different provenances and production conditions on antioxidant properties in buddleja globosa leaves. *Boletín Latinoam. y del Caribe Plantas Med. y Aromáticas.* 9(5):333–42
83. Wagner H. 2010. Synergy research: approaching a new generation of phytopharmaceuticals. *Fitoterapia.* 82(1):34–37
84. Wagner H, Bladt S. 2001. *Plant Drug Analysis: A Thin Layer Chromatography Atlas.* Springer. 369 pp. Second ed.
85. Wagner H, Ulrich-Merzenich G. 2009. Synergy research: approaching a new generation of phytopharmaceuticals. *Phytomedicine.* 16(2-3):97–110
86. Watanabe R, Nakamura H, Masutani H, Yodoi J. 2010. Anti-oxidative, anti-cancer and anti-inflammatory actions by thioredoxin 1 and thioredoxin-binding protein-2. *Pharmacol. Ther.* 127(3):261–70
87. Williamson EM. 2001. Synergy and other interactions in phytomedicines. *Phytomedicine.* 8(5):401–9
88. Williamson G, Manach C. 2005. Bioavailability and bioefficacy of polyphenols in humans. ii. review of 93 intervention studies. *Am. J. Clin. Nutr.* 81(1 Suppl):243S – 255S
89. World Health Organization. 1992. Informe 32 comite de expertos de la oms en especificaciones para las preparaciones farmacéuticas
90. World Health Organization. 1998. Quality controls methods for medicinal plants.
91. World Health Organization. 2005. Traditional medicine strategy. Geneve, Switzerland.
92. World Health Organization. 2005. National policy on traditional medicine and regulation of herbal medicines report of a who global survey
93. Wouters MA, Iismaa S, Fan SW, Haworth NL. 2011. Thiol-based redox signalling : rust never sleeps. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 43:1079–85
94. Wu G, Fang Y-Z, Yang S, Lupton JR, Turner ND. 2004. Glutathione metabolism and its implications for health. *J. Nutr.* 134(3):489–92

95. Yang CS, Sang S, Lambert JD, Lee M-J. 2008. Bioavailability issues in studying the health effects of plant polyphenolic compounds. *Mol. Nutr. Food Res.* 52 Suppl 1:S139–51
96. Young IS, Trimble ER. 1991. Measurement of malondialdehyde in plasma by high performance liquid chromatography with fluorimetric detection. *Ann. Clin. Biochem.* 28:504–8

9. ANEXOS

9.1. CERTIFICADOS DE ANÁLISIS, LABORATORIOS XIMENA POLANCO.



LABORATORIOS XIMENA POLANCO
Dresden 4640-San Miguel-Santiago-Chile
Fono-Fax: 551 5336
E-mail: ventas@xpolanco.com
www.xpolanco.com

Certificado de Análisis

Producto : **Matico T.M.**
Serie : 05 720 1
Código : 1110032
Vencimiento : 05. 2014
Tamaño lote : 34,9 kg

Fecha : 07.07.11
Nº Análisis : *SE - 1906
**B - 1163

Características Botánicas	Especificación	Análisis
Nombre científico	<i>Buddleja globosa</i>	Cumple
Parte de la planta utilizada	Hojas	Cumple
Características Organolépticas		
Aspecto	Líquido Transparente	Cumple
Color	Pardo	Café
Olor	Característico	Cumple
Características Físico-Químicas		
pH	5,00 – 7,00	5,5
Graduación Alcohólica (15°C)	40° - 55° GL	43° GL
Peso específico (20°C)	0,920 – 0,960 g/mL	0,947 g/mL
Residuo sólido	Mínimo 1,50 %	2,4 %
Identificación		
Flavonoides	Positivo	Positivo
Taninos	Positivo	Positivo
Saponinas	Positivo	Positivo


(*) Identificación Química:

Las manchas de identificación en cromatografía en capa fina de una alícuota de muestra son similares con las manchas de identificación de una alícuota estándar.

() Identificación Botánica:**

Las características de género y especie de una muestra de material vegetal corresponden a material vegetal estándar por confrontación de muestras.

Observación: 1 gramo de droga vegetal rinde 10 mL de extracto (T.M.)


Sonia Loyola M.
Analista


Q.F. Sdenka Barbery S.
Jefe Control de Calidad

UN COMPROMISO DE SERIEDAD.... UN COMPROMISO DE SERIEDAD.... UN COMPROMISO DE SERIEDAD...

9. 2. CERTIFICADO COMITÉ DE BIOÉTICA



UNIVERSIDAD DE CHILE - FACULTAD DE MEDICINA
Comité de Bioética Sobre Investigación en Animales


CERTIFICACIÓN

Este Comité, certifica que en el Proyecto de Investigación titulado: *“Relación de la concentración plasmática de polifenoles sobre la capacidad antioxidante de extractos herbales hidroalcohólicos de matico y llantén”* cuya investigadora responsable es la Dra(c) **Andrea Müller Sepúlveda**, y cuyos tutores son la Dra. María Eugenia Letelier y el Dr. Iván Saavedra, no se plantean acciones que contravengan las normas Bioéticas básicas de Manejo y Cuidados de los animales a utilizar en los procedimientos experimentales planificados (Protocolo CBA# 0486 FMUCH).

La Dra(c) Müller se ha comprometido a mantener los procedimientos experimentales planteados en el Protocolo de trabajo y a no realizar ninguna modificación sin previa información y posterior aprobación por parte de este Comité.

Se otorga la presente certificación por el tiempo que dure la realización del proyecto de tesis para obtener el grado de Doctora en Farmacología.

El Comité de Bioética sobre Investigación en Animales de la Facultad de Medicina, Universidad de Chile está constituido por nueve miembros con experiencia en el manejo y mantención de animales: 2 veterinarios, 6 académicos de diversas disciplinas y una periodista de esta Facultad. El certificado que emite el Comité procede de la aprobación del "PROTOCOLO DE MANEJO Y CUIDADOS DE ANIMALES DE LABORATORIO" después de un estudio acucioso por todos sus miembros y de la acogida de los investigadores o jefes de Bioterios, de las observaciones exigidas por el Comité.

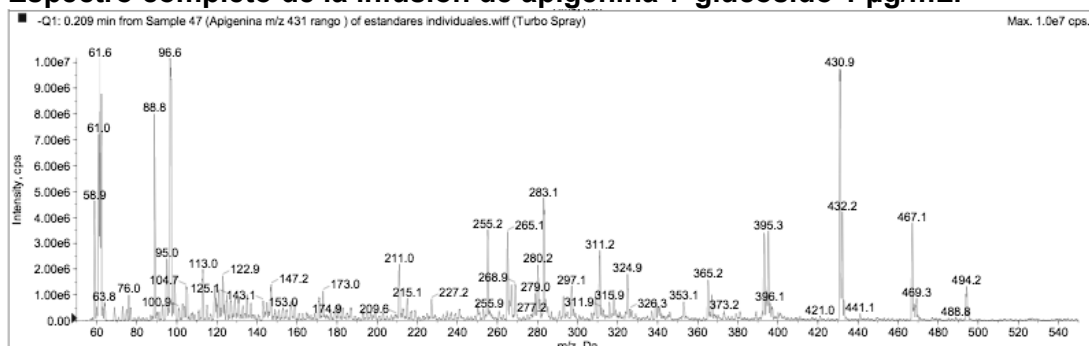

 Dr. Carlos Valenzuela Y.
 Presidente

Santiago, 16 de Enero de 2012.

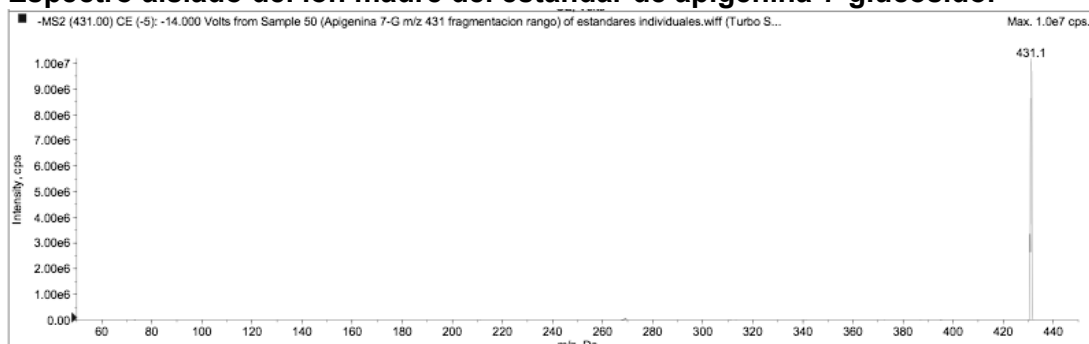
c.c.: Dra. M. E. Letelier, Facultad de Química y Farmacia, Universidad de Chile.
Dr. Iván Saavedra, Campus Occidente, Universidad de Chile

9.3. ESPECTROS LC/MS/MS DE LOS ESTÁNDARES DE POLIFENOLES

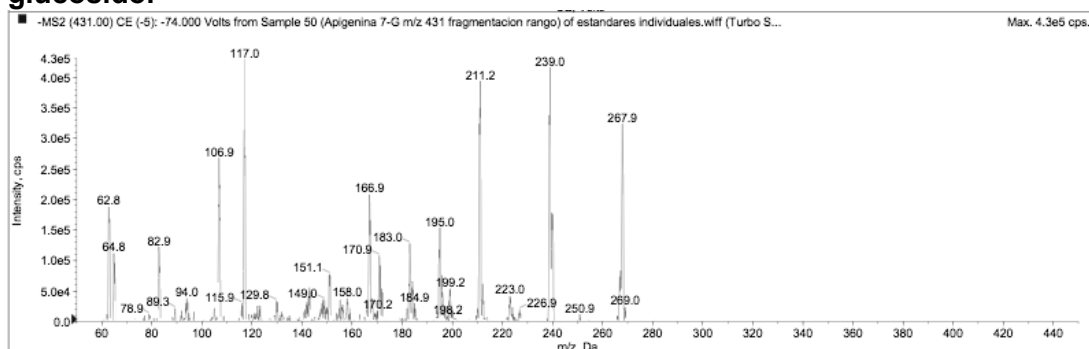
Espectro completo de la infusión de apigenina-7-glucósido 1 µg/mL.

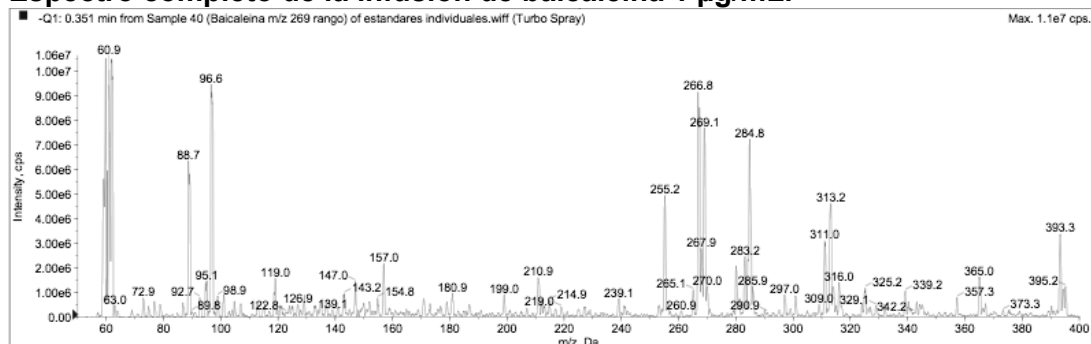
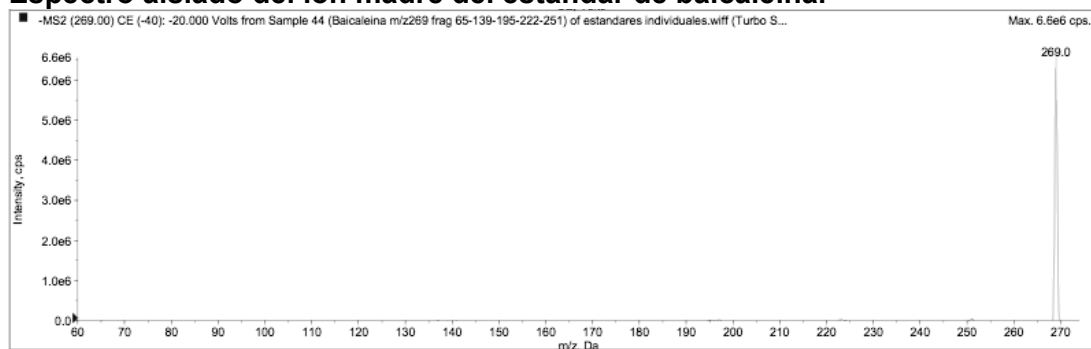
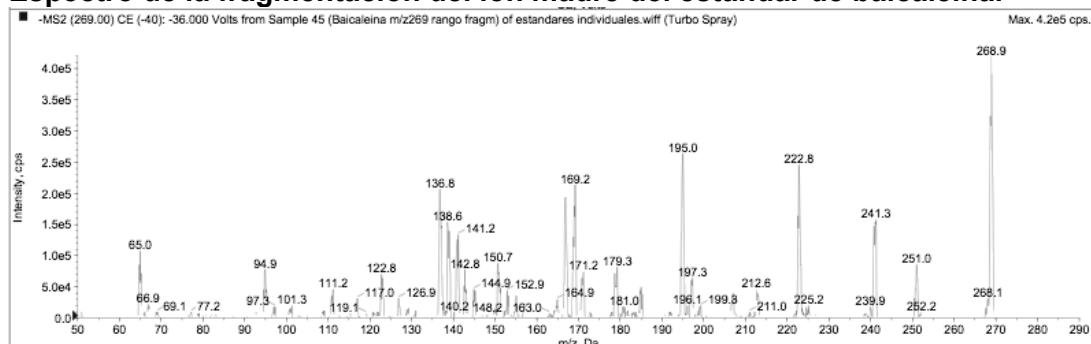


Espectro aislado del ion madre del estándar de apigenina-7-glucósido.

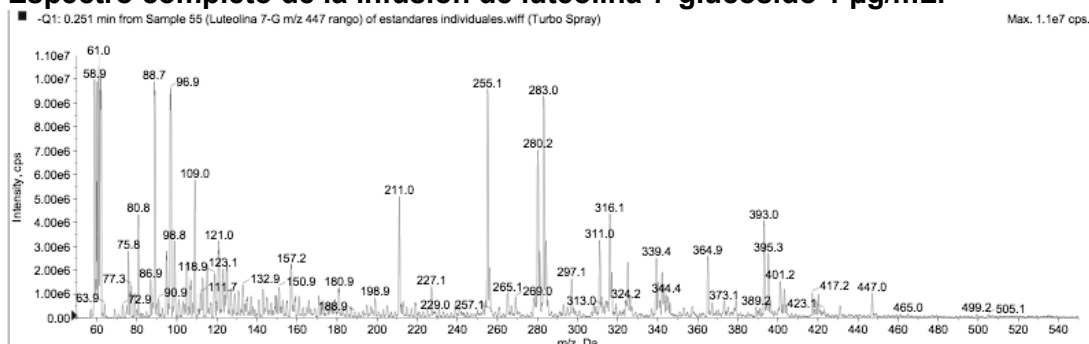


Espectro de la fragmentación del ión madre del estándar de apigenina-7-glucósido.

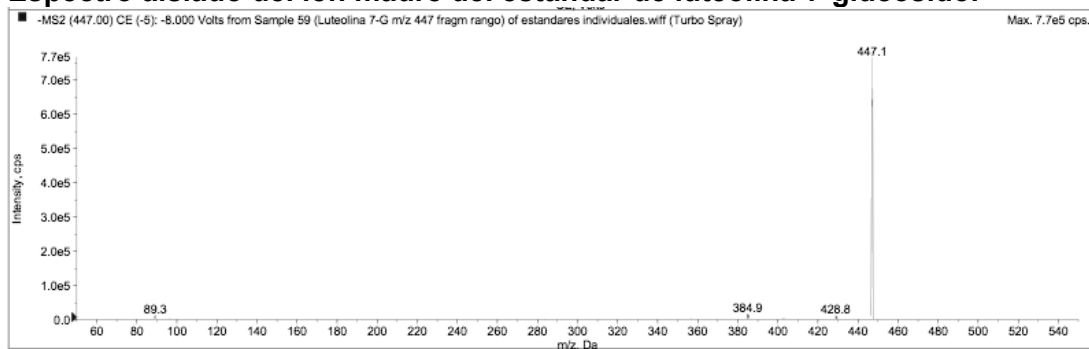


Espectro completo de la infusión de baicaleina 1 µg/mL.**Espectro aislado del ion madre del estándar de baicaleina.****Espectro de la fragmentación del ion madre del estándar de baicaleina.**

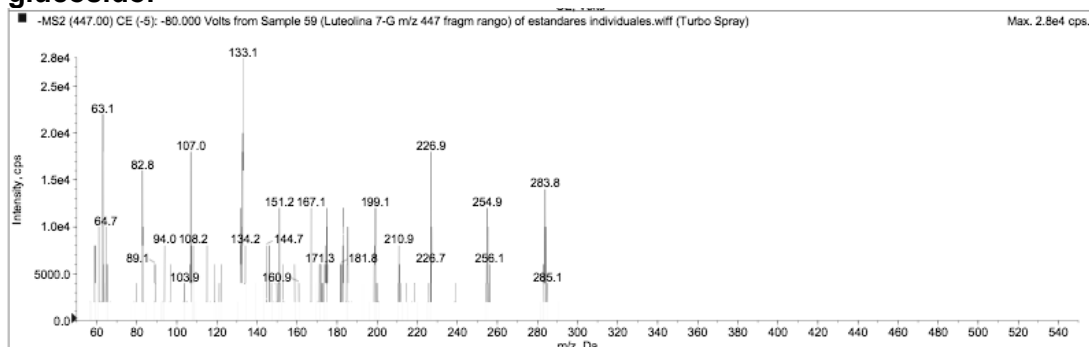
Espectro completo de la infusión de luteolina-7-glucósido 1 µg/mL.

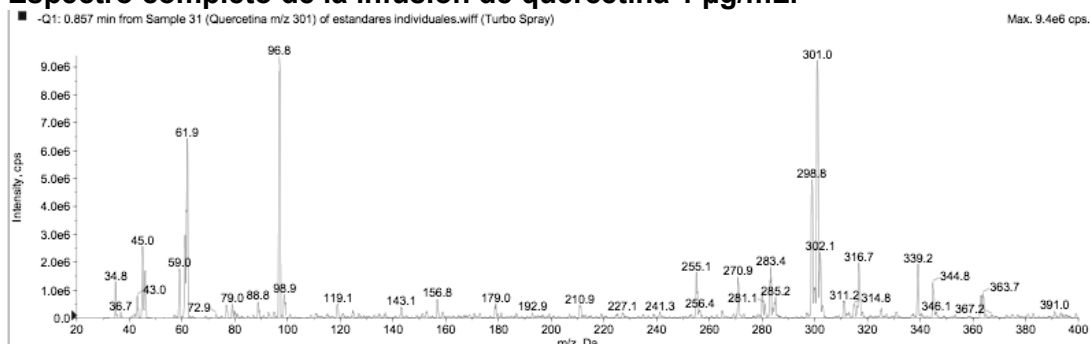
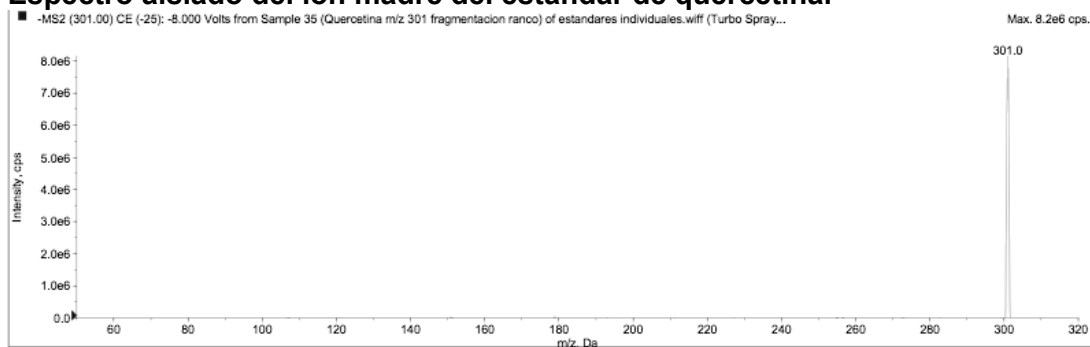
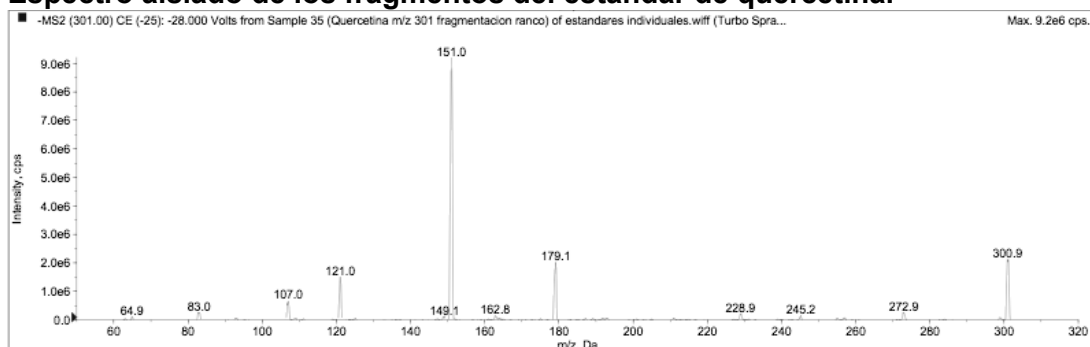


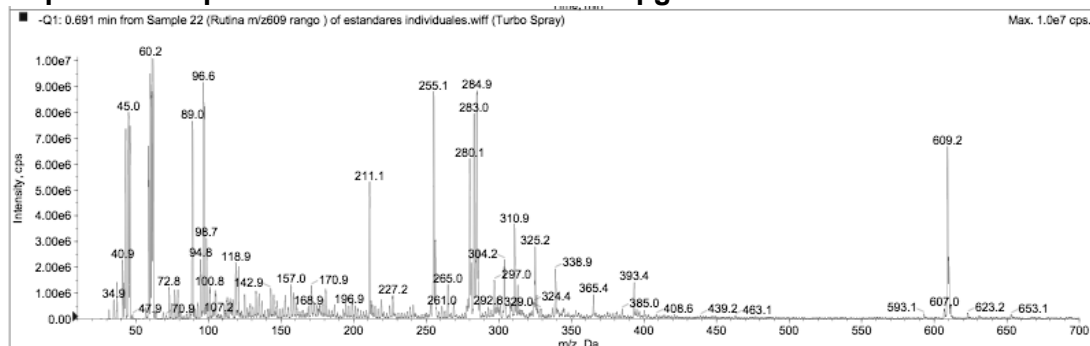
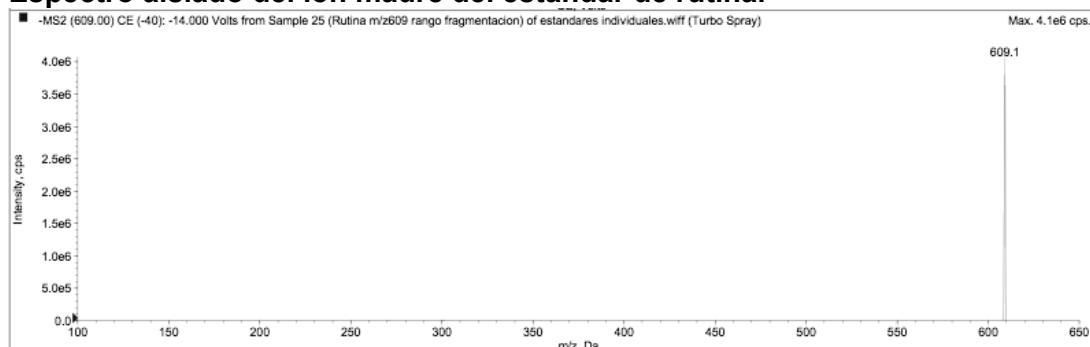
Espectro aislado del ion madre del estándar de luteolina-7-glucósido.



Espectro de la fragmentación del ión madre del estándar de luteolina-7-glucósido.



Espectro completo de la infusión de quercetina 1 µg/mL.**Espectro aislado del ion madre del estándar de quercetina.****Espectro aislado de los fragmentos del estándar de quercetina.**

Espectro completo de la infusión de rutina 1 µg/mL.**Espectro aislado del ion madre del estándar de rutina.****Espectro de la fragmentación del ión madre del estándar de rutina.**