



UNIVERSIDAD DE CHILE

FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS Y FARMACÉUTICAS

DEPARTAMENTO DE QUÍMICA FARMACOLÓGICA Y TOXICOLÓGICA

LABORATORIO DE FARMACOLOGÍA Y TOXICOLOGÍA

**CAPACIDAD ANTIOXIDANTE DE EXTRACTOS PROVENIENTES DE
HOJAS Y FRUTOS DE *Aristotelia chilensis* (MAQUI)**

Director

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

Patrocinante

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

Memoria de Título para optar al título de Químico Farmacéutico

FRANCISCA ALEJANDRA SILVA ARELLANO

Santiago de Chile

2017

*Yo no sé lo que es el destino,
caminando fui lo que fui.*

Silvio Rodríguez.

*Dedicada con especial cariño a todas
las personas que han aportado amor y
alegría a mi vida. Soy afortunada.*

AGRADECIMIENTOS

A Dios por siempre acordarse de mí y darme una ayudita cuando más miedo y tristeza he sentido, siempre me mostro el camino.

A la vida por darme tantas oportunidades de ser feliz y poner en mi camino a tanta gente que nos tendió la mano, y confió en mí. Los llevo a todos en el corazón.

A mi madre por su entrega completa, por darme un ejemplo de lucha ante la vida y nunca rendirse hasta conseguir sus objetivos, por levantarse y enfrentarse a la vida cada vez que fue necesario.

A mis hermanas María José, Camila y América, por existir, por darme tan bellos recuerdos en la niñez, y por recordarme diariamente que todos nuestros actos influyen en los otros.

A mi sobrina Martina, que es una lucecita de esperanza y a Jonathan que fue parte importante en mi vida; gracias a su contención y amor logré sobrellevar muchas dificultades.

A mis amigos Catalina y Elías, por hacer más grato todo el proceso de memoria de título, por su apoyo incondicional y ánimo en esta experiencia de formación profesional.

A mis amigos Mary-Carmen, Javiera, María Luisa, Constanza, Camila, Francisco, Fabrizio, Natalia, Valerie, Paula por acompañarme en todo este proceso, por su apoyo y animo en los momentos difíciles.

A mis amigos de la vida, Yuenli, Amanda, Vanessita, Daniela, por acompañarme en los momentos más felices y también más difíciles; a mis tíos David y Yolanda, que han aportado con su alegría y amor, a ser lo que hoy soy.

En especial, agradecer a la Profesora María Eugenia Letelier, por su confianza, dedicación, paciencia y amor, por darme la oportunidad de trabajar con ella, y enseñarme el camino para ser una profesional integral.

Agradecer a todo el personal que colabora en el laboratorio de Farmacología y Toxicología y a Laboratorios Ximena Polanco que donó los extractos estandarizados de maqui.

ABREVIATURAS

SOD	: Superóxido dismutasa.
TBA	: Thiobarbituric acid (Ácido tiobarbitúrico)
MDA	: Malondialdehído.
EDTA	: Ácido Etilen-diamino tetra-acético

ÍNDICE GENERAL

Portada.....	Pág. I
Dedicatoria.....	Pág. II
Agradecimientos.....	Pág. III
Abreviaturas.....	Pág. IV
Índice de Tablas.....	Pág. VI
Índice de Figuras.....	Pág. VII
Resumen.....	Pág. VIII
Abstract.....	Pág. IX
INTRODUCCIÓN	Pág. 1
Hipótesis.....	Pág. 8
Objetivo General.....	Pág. 9
Objetivos Específicos.....	Pág. 9
MATERIALES Y MÉTODOS	Pág. 10
Reactivos.....	Pág. 10
Animales de experimentación.....	Pág. 10
Preparación de microsomas hepáticos de rata.....	Pág. 11
Cuantificación de Polifenoles.....	Pág. 11
Condiciones oxidativas.....	Pág. 12
Lipoperoxidación microsómica.....	Pág. 12
Determinación de tioles microsómicos.....	Pág. 14

Determinación de la actividad GSH-transferásica.....	Pág. 15
Quelación de Cu ²⁺	Pág. 15
Análisis Estadístico.....	Pág. 16
RESULTADOS	Pág. 17
Contenido de Polifenoles de los extractos de maqui.....	Pág. 17
Lipoperoxidación microsómica inducida por el sistema Cu ²⁺ /ascorbato en presencia de los extractos de maqui.....	Pág. 19
Oxidación de tioles microsómicos inducida por el sistema Cu ²⁺ / ascorbato en presencia de los extractos de maqui.....	Pág. 22
Contenido de tioles de los extractos de maqui.....	Pág. 27
Capacidad quelante de Cu ²⁺ de los extractos de maqui.....	Pág. 32
DISCUSIÓN	Pág. 35
CONCLUSIONES	Pág. 38
REFERENCIAS	Pág. 39

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla	Título de la Tabla	Página
1	Contenido de Polifenoles de los extractos de maqui.	18
2	Contenido de tioles de los extractos de maqui.	28
3	Prevención de la oxidación de tioles microsómicos.	29

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura	Título de la Figura	Página
1	Lipoperoxidación microsómica inducida por Cu^{2+} /ascorbato en presencia de extracto de hojas de maqui.	20
2	Lipoperoxidación microsómica inducida por Cu^{2+} /ascorbato en presencia del extracto de frutos de maqui.	21
3	Gráficos semilogarítmicos de la Lipoperoxidación microsómica inducida por Cu^{2+} /ascorbato en presencia de los extractos de hojas y frutos de maqui.	22
4	Oxidación de los tioles microsómicos inducida por el sistema Cu^{2+} /ascorbato en presencia del extracto de hojas de maqui.	24
5	Oxidación de tioles microsómicos inducida por el sistema Cu^{2+} /ascorbato en presencia del extracto de frutos de maqui.	25
6	Gráficos semilogarítmicos de la oxidación de los tioles microsómicos inducida por Cu^{2+} /ascorbato en presencia de los extractos de hojas y frutos de maqui.	26
7	Curva estándar de GSH cuya concentración fue determinada utilizando el método del DTNB.	27
8	Reversión de la oxidación de los tioles microsómicos inducida por Cu^{2+} /ascorbato.	30
9	Efecto de los extractos de maqui sobre la actividad catalítica de la GSH-transferasa microsómica.	31
10	Espectros de absorbancia de Cu^{2+} en presencia y ausencia de los extractos de maqui.	33
11	Espectros de absorbancia de Cu^{2+} en presencia y ausencia de los extractos de maqui.	34

CAPACIDAD ANTIOXIDANTE DE EXTRACTOS PROVENIENTES DE HOJAS Y FRUTOS DE *Aristotelia chilensis* (MAQUI).

Maqui (*Aristotelia chilensis*) es una planta nativa chilena cuyos frutos son utilizados en la preparación de productos que se comercializan como alimentos funcionales y fitofármacos por su alto contenido de antioxidantes en comparación con otros berries, además de sus propiedades antiinflamatorias y antibacterianas. Las hojas constituyen en general, la parte de las plantas que contiene mayor cantidad de antioxidantes. Los estudios acerca de las propiedades benéficas de las hojas del maqui sin embargo, son escasos. Es por esto que nos interesó comparar las propiedades antioxidantes de extractos de fruto y hojas de esta planta. Para ello, se utilizó como sistema biológico microsomas hepáticos de rata, y como sistema prooxidante, Cu^{2+} /ascorbato. Ambos extractos: 1) previnieron la lipoperoxidación microsómica, 2) previnieron y revirtieron la oxidación de los tioles microsómicos. Estos fenómenos fueron dependientes de las concentraciones de polifenoles y tioles de ambos extractos, pero la potencia antioxidante del extracto de hojas fue mayor que la del extracto de fruto. La calidad y cantidad de los antioxidantes presentes en estos extractos podría explicar esta diferencia. Por otra parte, ambos extractos fueron capaces de quelar el ion Cu^{2+} e inhibir la actividad de la GSH-transferasa microsómica, enzima cuya forma activa es un dímero –S-S–.

Cabe destacar que extractos polivalentes como los ensayados, ejercen su poder antioxidante por diversos mecanismos actuando de manera sinérgica. Todas las patologías en mayor o menor grado están asociadas a estrés oxidativo. Por lo tanto, las propiedades antioxidantes de extractos herbales justifican por si solas las coterapias que involucran fármacos sintéticos y fitofármacos. No debemos olvidar sin embargo, que los fitofármacos deben tener estudios farmacológicos que aseguren su seguridad y eficacia como también su posología.

ANTIOXIDANT CAPACITY OF EXTRACTS OF LEAVES AND FRUITS FROM *Aristotelia chilensis* (MAQUI). Maqui (*Aristotelia chilensis*) is a native Chilean plant whose fruits are used in the preparation of products that are marketed as functional foods and phytodrugs with a high antioxidant content compared to other berries, in addition to its anti-inflammatory and antibacterial properties. The leaves generally constitute the part of plants that contains the most amounts of antioxidants. Studies on the beneficial properties of the leaves of the maqui, however, are scarce. This is why we were interested in comparing the antioxidant properties of fruit extracts and leaves of this plant. For this, liver microsomes of rat were used as biological system and as a prooxidant Cu^{2+} /ascorbate system. Both extracts: 1) prevented microsomal lipid peroxidation, 2) prevented and reversed the oxidation of microsomal thiols. These phenomena were dependent on polyphenol and thiol concentrations of both extracts, but antioxidant potency of leaves extract was higher than that of fruit extract. La calidad y cantidad de los antioxidantes presentes en estos extractos podría explicar esta diferencia. On the other hand, both extracts were able to chelate the Cu^{2+} ion and inhibit the activity of the microsomal GSH-transferase, enzyme whose active form is an -S-S- dimer.

It is noteworthy that polyvalent extracts exert their antioxidant power by various mechanisms acting synergistically. All pathologies to a greater or lesser degree are associated with oxidative stress. Therefore, the antioxidant properties of herbal extracts alone justify the co-therapies involving synthetic drugs and phytodrugs. We cannot forget, however, that phytodrugs must have pharmacological studies that ensure their safety and efficacy as well as their dosage.

I. INTRODUCCIÓN

El **estrés oxidativo** es un fenómeno que implica un desbalance entre las especies oxidantes y antioxidantes celulares. Estas especies comprenden:

- *Especies reactivas del oxígeno (EROs) como H_2O_2 , $O_2^{\cdot-}$, HO^{\cdot}*
- *Especies reactivas del nitrógeno (ERNs) como el NO^{\cdot}*
- *Especies electrofílicas resultantes del metabolismo de xenobióticos*

Las EROs y las ERNs cumplen roles fisiológicos, por lo mismo su concentración en el organismo es regulada, función que es llevada a cabo por diferentes mecanismos, que agrupados constituyen la **capacidad antioxidante celular**. Cuando esta capacidad es sobrepasada se genera **estrés oxidativo** [1,2].

Mecanismos enzimáticos:

- *La superóxido dismutasa (SOD), que cataliza la dismutación del $O_2^{\cdot-}$ a peróxido de hidrógeno.*
- *La GSH-peroxidasa que reduce hidroperóxidos a alcoholes.*
- *La catalasa que reduce peróxido de hidrógeno a H_2O .*
- *La GSH-transferasa que conjuga especies electrofílicas con GSH.*

Mecanismos no enzimáticos:

- *Atrapamiento de especies radicalarias del oxígeno.* Este mecanismo se refiere específicamente a la capacidad de los antioxidantes de reducir o entregar electrones a las especies radicalarias que son especies deficientes en electrones.

- *Quelación de metales de transición.* Estos metales, en su estado reducido iónico libre, reducen al oxígeno molecular generando ROS a través de las reacciones de Haber-Weiss y/o Fenton.
- *Inhibición de la actividad y/o de la expresión de las enzimas antioxidantes y proteínas antiapoptóticas* (Bcl: B cell lymphoma, caspasas).
- Activación de la expresión de citoquinas proinflamatorias (TNF- α , IL-6) y de factores de transcripción nuclear como NF- κ B (nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells).
- Inhibición de enzimas que participan directa o indirectamente en la generación de EROs (NOX, COX).

Especies electrofílicas. Estas especies tóxicas se generan por biotransformación de compuestos endógenos y xenobióticos [3]. Su toxicidad se debe a que ellas se unen covalentemente a nuestras biomoléculas, todas ellas compuestos nucleofílicos, alterando así su estructura y función. La célula se defiende conjugando las especies electrofílicas con Glutación (GSH), reacción catalizada por la GSH-transferasa. El GSH es el antioxidante no enzimático mayoritario celular y por tanto, al ser consumido en estas reacciones de conjugación, se disminuye la capacidad antioxidante celular lo cual puede conducir a estrés oxidativo.

A través de los mecanismos antioxidantes mencionados la célula anula la reactividad y/o inhibe la generación de EROs, ERNs y especies electrofílicas, controlando así el desbalance entre las especies antioxidantes y oxidantes que caracteriza el fenómeno de estrés oxidativo. La generación de estrés oxidativo en un organismo tiene diversos orígenes, entre ellos, los más importantes son los diversos estados patológicos, el metabolismo de fármacos lipofílicos a través del sistema oxidativo del CYP4

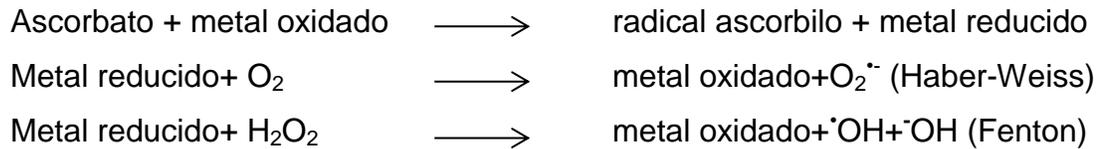
50, la exposición a la luz solar, la ingesta de alimentos fritos en aceites oxidados. El estrés oxidativo provoca la alteración de la funcionalidad celular y por tanto, se generan estados patológicos [4].

Antioxidantes. La eficacia de los compuestos antioxidantes está relacionada directamente con sus propiedades físico-químicas, entre ellas, la principal es la liposolubilidad. De esta propiedad depende la absorción y distribución en el organismo de los fármacos y por tanto, también su eficacia farmacológica. Los organismos animales poseen antioxidantes endógenos polares y apolares.

Antioxidantes polares o hidrofílicos celulares: Ellos están representados por el GSH y la Vitamina C o ácido ascórbico. El GSH es el más abundante; en condiciones de estrés oxidativo puede alcanzar en la célula hepática concentraciones 10mM.

Antioxidantes lipofílicos celulares: Estos compuestos incluyen la Vitamina E, el α -tocoferol y la Vitamina A, los cuales se encuentran en concentraciones μ M. Desafortunadamente, estos compuestos al ser metabolizados a través del sistema oxidativo P450, pueden generar intermediarios pro-oxidantes.

Las plantas, como seres vivos, necesitan mecanismos semejantes a los animales, para defenderse de las agresiones a las que el medio ambiente las expone [5,6]. Así, las plantas poseen polifenoles y tioles los cuales representan los antioxidantes celulares mayoritarios. Los mecanismos antioxidantes son similares a los de la célula animal, aunque ella no posee polifenoles como la célula vegetal. Entre estos mecanismos se incluyen su capacidad de atrapar radicales libres y de quelar metales de transición en su estado iónico libre, los cuales generan EROs a través de las reacciones de Haber Weiss y/o Fenton [5-10].



Cabe señalar que existen diferencias entre las propiedades antioxidantes de los compuestos polifenólicos y tiólicos. Así, la oxidación de las biomoléculas tiólicas puede ser revertida por agentes antioxidantes tiólicos, pero no la de los polifenoles cuyo producto oxidado corresponde a una quinona, compuesto electrofílico que puede ser muy tóxico para el organismo humano [8-10]. El estado redox de los sistemas tiólicos que son sensibles a oxidantes no-radicalarios, son controlados por las tioredoxinas (Trx), GSH y cisteína. En todo tipo de células esta reversibilidad es el resultado de mecanismos enzimáticos concertados que involucran al tripéptido GSH [11-14]. Los sistemas regulados por las tioredoxinas y el GSH se mantienen en condiciones estables pero no en equilibrio, debido a una continua oxidación de los tioles celulares; ellos se oxidan a una velocidad aproximada de 0,5% de los tioles totales/min [14,15].

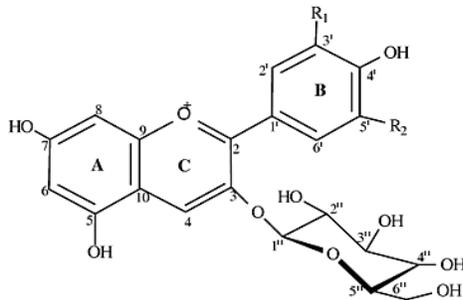
Una hipótesis complementaria se ha propuesto para explicar los mecanismos involucrados en el estrés oxidativo. Esta hipótesis postula que el estrés oxidativo puede ocurrir sin la presencia de radicales libres del oxígeno [16]. Así, además de participar en reacciones redox, los compuestos polifenólicos y tiólicos pueden actuar como agentes nucleofílicos formando aductos covalentes con metabolitos electrofílicos [8-12]. Los metabolitos electrofílicos son altamente reactivos y por tanto, muy tóxicos; ellos pueden reaccionar con proteínas y ácidos nucleicos (ARN y ADN) debido a la presencia de grupos amino y sulfhidrilos en estas macromoléculas. Como se mencionó anteriormente, los compuestos electrofílicos pueden ser generados como productos de la biotransformación de xenobióticos, entre ellos, los fármacos; estos compuestos son también componentes de los contaminantes ambientales [17]. Cabe señalar

que cuando los compuestos polifenólicos y tiólicos reaccionan como nucleófilos formando aductos covalentes, ellos son consumidos irreversiblemente, lo que provoca una disminución de la capacidad antioxidante celular [17]. En este sentido, los compuestos tiólicos parecen ser agentes nucleofílicos más eficientes que los polifenoles [9,18].

Los metabolitos electrofílicos incluyen peróxidos, aldehídos, quinonas y epóxidos los cuales son generados enzimáticamente a partir de precursores endógenos y exógenos [13]. Si estos compuestos se generan en forma aberrante, ellos pueden afectar los circuitos tiólicos, alterando las funciones biológicas de ellos. Más aún, los tioles de bajo peso molecular, GSH y cisteína, pueden actuar como agentes quelantes de iones metálicos, lo cual también podría ocurrir con los grupos tiólicos redox sensibles de proteínas y bases púricas y pirimídicas, alterando su función [14,15]. De estos antecedentes se concluye que el estrés oxidativo puede también ocurrir como consecuencia de un cambio redox de los circuitos tiólicos y del consumo irreversible debido a la formación de aductos covalentes entre los compuestos electrofílicos y los tioles celulares [16]. El estrés oxidativo inducido a través de los circuitos tiólicos parece ser más importante que el generado por las EROs. Así, existen tioles redox-sensibles presentes en diferentes proteínas y/o péptidos que son críticos en transducción de señales (ej. H-Ras, PTP-1B), factores de transcripción que se unen a DNA (ej. Nrf2, NFκβ), activación de receptores (ej. integrina αIIbβ3 en la activación de plaquetas), etc. Más aún, el envejecimiento, como también, las enfermedades relacionadas con el envejecimiento, se asocian a la interrupción de la función y a la homeostasis de los circuitos tiólicos, característica central del estrés oxidativo observado [13]. Cabe destacar además, que la GSH-transferasa, enzima que cataliza la conjugación de compuestos electrofílicos con GSH es activa en su forma dimérica -S-S-, por lo tanto, su reducción a los monómeros -SH que le dieron origen, debería inhibir su actividad catalítica.

Berries y su capacidad antioxidante.

Los berries son frutos carnosos que se caracterizan por poseer un alto contenido de compuestos antocianos. Estos compuestos son glicósidos de polihidroxi- y polimetoxi- derivados de 2-fenilbenzopirilium o sales de flavilium. La diferencia entre las antocianinas está relacionada con el número de grupos hidroxilos, la naturaleza de los azúcares unidos a la molécula, la posición de las uniones y la naturaleza y número de ácidos alifáticos o aromáticos unidos a los azúcares de la molécula. Solo 5 antocianidinas son las que se encuentran en la mayoría de las plantas: pelargonidina (pg), peonina (pn), cianidina (cy), malvidina (mv) y delfinina (dp) [19].



Estructura química de los antocianos. Dp (1, $R_1=H$, $R_2=H$);
Cy 3-glu (3, $R_1=OH$, $R_2=H$); Pg 3-glu (5, $R_1=H$, $R_2=H$); Pn 3-glu
(6, $R_1=OCH_3$, $R_2=H$); Mv 3 glu (7, $R_1=OCH_3$, $R_2=OCH_3$);

Los compuestos antocianos poseen probada actividad antioxidante y antimicrobiana [20]. Además, son colorantes naturales del tipo flavonoides los cuales están presentes particularmente en flores y berries. Los antocianos pueden actuar como antioxidantes debido a su capacidad de interactuar con especies radicalarias mediante la donación de electrones o hidrógenos, o bien atrapando radicales libres [21]. El consumo de alimentos vegetales ricos en antocianos se asocia a un menor riesgo de enfermedades crónicas, tales como cáncer y enfermedades cardiovasculares, efecto que se relaciona con la alta concentración de polifenoles [22]. Por otro lado, diversos estudios han mostrado

que los antocianos presentan además, actividad antimicrobiana frente a patógenos de importancia clínica, tales como cepas de *Salmonella*, *Staphylococcus*, *Streptococcus*, *Pseudomonas*, *Neisseria*, entre otros [23–25]. Se ha descrito además, la capacidad de los antocianos de prevenir mutaciones del ADN, presentar actividad estrogénica, impulsar la producción de citoquinas, presentar actividad antiinflamatoria e inhibir la lipoperoxidación, y disminuir la permeabilidad y la fragilidad capilar [19].

Dentro de los berries de importancia en Chile, encontramos el caso de *Ugni molinae* (murtilla), *Aristotelia chilensis* (maqui) y *Vaccinium corymbosum* (arándano), los cuales han sido tradicionalmente utilizados por la población autóctona para el tratamiento de heridas e infecciones asociadas [26]. Existen estudios que relacionan la presencia de antocianos en los frutos de estos berries con su actividad antiinflamatoria, antioxidante y antimicrobiana; sin embargo, estudios de preparados de sus hojas son escasos [22, 26-31].

***Aristotelia chilensis* (maqui)** es un arbusto de hoja perenne, nativo de Sudamérica que pertenece a la familia *Elaeocarpaceae* y produce pequeños berries de color púrpura/negro. El intenso color rojo de los extractos acuosos de esta fruta es debido a la presencia de antocianinas. Estudios previos dicen que las hojas del maqui poseen alcaloides indólicos y quinolínicos. En cambio el fruto posee principalmente antocianinas, delfinidinas y glucósidos de cianidina. [27]. Se ha prestado especial atención a las antocianinas presentes en los frutos, no solo por su uso como colorante natural, sino que también, por sus potenciales efectos benéficos en la salud humana. Así, sus frutos se han utilizado como suplementos alimenticios en alimentos funcionales. Asimismo, se han descrito efectos potenciales como por ejemplo, actividad anti-aterogénica, inhibición del virus VIH, prevención de problemas visuales y actividad contra algunos tipos de leucemia humana y carcinoma de colon humano [32].

Los antecedentes presentados muestran que los estudios existentes han sido realizados en muestras de frutos. Estudios farmacológicos *in vitro* o *in vivo*, a partir de preparados de hojas de maqui son muy escasos. Es por ello que en este trabajo de memoria de título comparamos la actividad antioxidante biológica de extractos preparados a partir del fruto y de las hojas de maqui. Nosotros postulamos que el contenido de antioxidantes de sus hojas (polifenoles y tioles) debería ser mayor que el de sus frutos. Esto debido a la mayor exposición de las hojas a las agresiones ambientales como la luz solar, SMOG, temperatura, disponibilidad hídrica, etc.

Los resultados obtenidos demostraron que existen diferencias en la capacidad antioxidante de los extractos de fruto y hojas de maqui. Esta diferencia favoreció al extracto de hojas, la cual se vio reflejada tanto en el contenido de antioxidantes como también en su capacidad antioxidante. Estos resultados se discuten en términos de la formulación de preparados antioxidantes para su uso como co-terapias en el tratamiento de enfermedades especialmente asociadas a estrés oxidativo, entre las cuales podemos mencionar las enfermedades neurodegenerativas, cardiovasculares, diabetes y cáncer.

HIPÓTESIS

Extractos de hojas y frutos de *Aristotelia chilensis* previenen en forma diferencial la oxidación de los lípidos y proteínas constituyentes de microsomas hepáticos de rata.

OBJETIVO GENERAL

Caracterizar extractos de hoja y fruto de maqui en cuanto a su actividad antioxidante.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Determinar la concentración total de polifenoles de los preparados de hojas y fruto de maqui.
2. Determinar la capacidad de los preparados de prevenir la lipoperoxidación microsómica inducida por el sistema Cu^{2+} /ascorbato.
3. Evaluar la capacidad de los extractos de prevenir y revertir la oxidación de los tioles microsómicos inducida por el sistema Cu^{2+} /ascorbato.
4. Determinar la concentración total de tioles contenidas en los extractos de hojas y fruto de maqui.
5. Evaluar la capacidad de los extractos de inhibir la actividad GSH-transferásica hepática de rata.
6. Determinar la capacidad quelante de metales a través de la modificación del espectro de absorbancia del ion Cu^{2+} .

II. MATERIALES Y MÉTODOS

Reactivos. BSA, CuSO₄, Catequina [(+)-cianidol-3,(2*R*,3*S*)-2-(3,4-dihidroxifenil)-3,4-dihidro-1(2*H*)-benzopiran-3,5,7-triol], reactivo de Folin-Ciocalteu, ascorbato de sodio, ácido 5,5'-ditio-*bis*(2-nitrobenzoico (DTNB), 1-cloro-2,4-dinitrobenceno, GSH, N-acetil-cisteína y ácido etilen-diamino-tetraacético (EDTA) se obtuvieron de Sigma-Aldrich. El ácido tiobarbitúrico (TBA), fue adquirido de Merck (Chile). El resto de los reactivos utilizados fue del mejor grado analítico.

Los extractos de maqui fueron donados por Laboratorios Ximena Polanco. El extracto de hojas de maqui entregado estaba constituido por un extracto estandarizado seco diluido en excipientes. El extracto de fruto de maqui en cambio, fue un preparado hidroalcohólico. La metodología utilizada para preparar estos extractos es información privada de la empresa que tuvo la gentileza de compartir con nosotros, la cual fue utilizada en la expresión del contenido de polifenoles totales de ambos extractos.

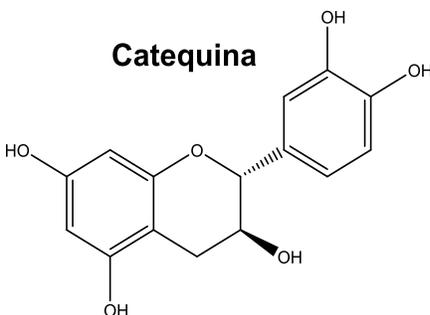
Soluciones 0,1mg, 1mg y 10mg del extracto seco de hoja de maqui/mL fueron preparadas como “soluciones madre” para el desarrollo de todos los experimentos; esta solución fue alicuotada y mantenida a -20°C para su posterior uso. Por otra parte, el extracto líquido de fruto de maqui fue diluido 30 y 200 veces. Estas soluciones fueron igualmente alicuotadas y almacenadas a -20°C.

Animales de experimentación. Se utilizaron ratas macho adultas de la cepa Sprague Dawley, de tres meses de edad y de un peso corporal aproximado de 250g. Estos animales se obtuvieron del Bioterio de la Facultad de Medicina de la Universidad de Chile. Los animales se mantuvieron con una dieta normal de *pellet*, agua *ad libitum*, ciclos de luz y oscuridad, y a una temperatura ambiental

de 21°C. Todos los procedimientos se desarrollaron de acuerdo a los protocolos aprobados por el Comité Ético Institucional de la misma Facultad.

Preparación de microsomas hepáticos de rata. Esta fracción subcelular se preparó de acuerdo a Letelier y cols., 2010 [33]. Las ratas fueron sometidas a ayuno por 15h con agua *ad libitum*, y sacrificadas por decapitación. Los hígados fueron perfundidos *in situ* con 0,9% P/V NaCl, removidos por incisión, y puestos en hielo. Todos los procedimientos de homogenización y fraccionamiento se realizaron a 4°C, y todas las centrifugaciones fueron realizadas usando ya sea una centrifuga con refrigeración Hermle modelo Z326K o una ultracentrífuga Beckman modelo XL-90. El tejido hepático (9-11g de peso húmedo), carente del tejido conectivo y vascular, fue homogenizado con 4 volúmenes de KCl 0,154M, con ocho pasajes en un homogeneizador Dounce Wheaton B utilizando un motor Heidolph modelo RZR1 a 250rpm. El homogeneizado fue centrifugado a 9.000g por 15min y el sedimento fue descartado. El sobrenadante obtenido fue centrifugado a 105.000g por 60min. El *pellet* (microsomas) se almacenó a -80°C en un *freezer* IL-Shin modelo DF8514 por hasta 3 meses. La cuantificación de la proteína microsómica se determinó por el método de Lowry *et al.*, 1951 [34], utilizando albúmina sérica de bovino (fracción IV) como estándar.

Cuantificación de Polifenoles: La determinación de polifenoles totales se realizó de acuerdo al método de Letelier y cols., (2009b) [35], con una sola modificación. Este método utiliza catequina como estándar



La mezcla de reacción (5mL volumen final) contenía diferentes concentraciones de los extractos herbales diluidos en agua, 100µL de reactivo Folin Ciocalteau, 300µL de carbonato de sodio 20% p/V y agua destilada suficiente para completar 5mL. El blanco contenía todos los reactivos con excepción de los extractos herbales. Todas las mezclas así obtenidas fueron incubadas a oscuridad durante 2h. Al finalizar este período, la absorbancia de las muestras fue registrada a 760nm en un espectrofotómetro UV3 Unicam UV-VIS, usando los blancos respectivos como referencia. La linealidad de este método se analizó realizando una curva de calibración utilizando catequina como estándar.

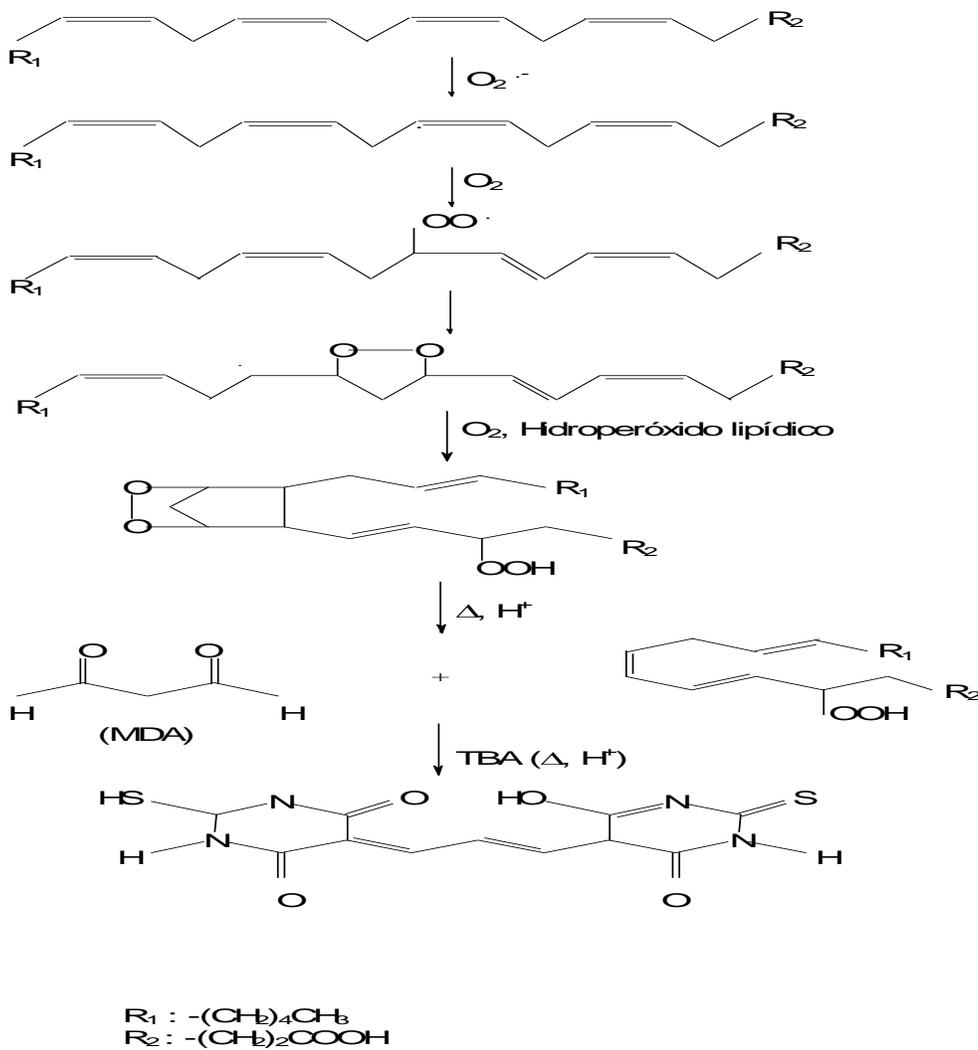
Condiciones oxidativas: Se utilizó el sistema generador de anión superóxido (O_2^-), $CuSO_4$ 25µM y ascorbato 1mM, ambas concentraciones finales en la mezcla de reacción.

Lipoperoxidación microsómica: La lipoperoxidación microsómica inducida por el sistema oxidante Cu^{2+} /ascorbato se estimó determinando las sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico (TBARS) de acuerdo al método descrito por Letelier y cols., 2014 [36]. El malondialdehído, generado como producto de la descomposición de los lipoperoxidos formados, reacciona con el ácido tiobarbitúrico dando lugar a un conjugado, el cual posee una absorbancia máxima a 532nm ($\epsilon_{532} = 156.000 M^{-1} cm^{-1}$).

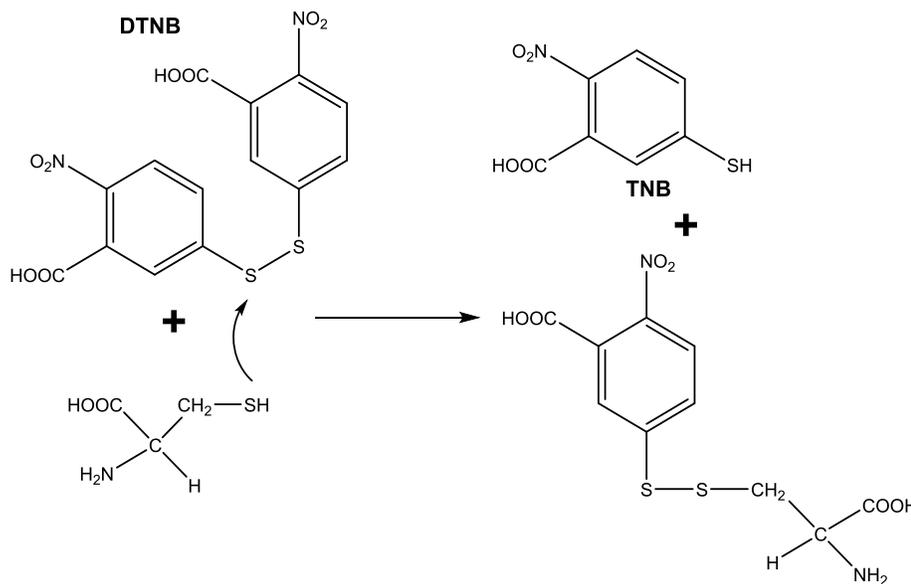
La mezcla de reacción contenía en concentraciones finales en 1mL de volumen final: 0,5mg de proteína microsómica suspendidos en amortiguador fosfato 50mM, pH 7,4; sulfato de cobre 25µM y ascorbato de sodio 1mM. Los blancos contenían todos los reactivos con la única excepción de la proteína microsómica. Muestras y blancos se incubaron durante 40min a 37°C. Al cabo de este período, se les adicionó a las muestras y los blancos 0,3mL de TCA 20% p/V frío (4°C). Luego, los tubos que contienen proteína microsómica fueron centrifugados a 9000g durante 10min a 4°C en una centrífuga Hermle, modelo

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

La reacción de oxidación y formación del conjugado coloreado es la siguiente:

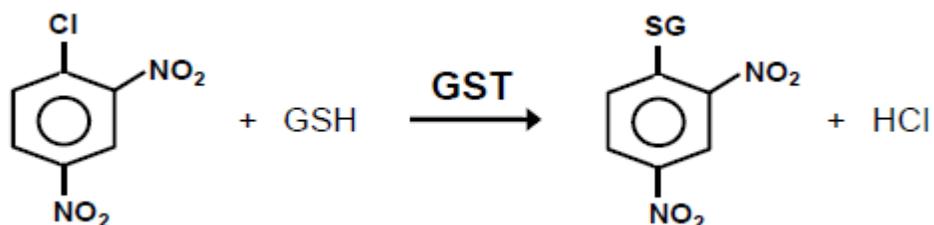


Determinación de tioles microsómicos. La medición de los tioles totales microsómicos se realizó de acuerdo a la técnica descrita por Letelier y cols., 2005 [37]. Esta técnica cuantifica espectrofotométricamente el TNB liberado en la reacción entre el DTNB y los grupos tiólicos presentes en la muestra. Este compuesto absorbe a 412nm y su coeficiente de extinción es $13.600 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$.



La mezcla de reacción contenía en un volumen final de 1mL: proteína microsómica (0,5mg/mL); amortiguador fosfato 50mM, pH 7,4; DTNB 0,3mM. Los blancos contenían todos los reactivos a excepción de la proteína microsómica. Mezclas y blancos se incubaron durante 30min a 37°C, en un baño termostático y con agitación constante. Al cabo de este periodo, los tubos se enfriaron y se leyeron las absorbancias de las muestras a 412nm en un espectrofotómetro Unicam UV VIS modelo UV3 acoplado a un computador, utilizando sus blancos respectivos como referencia. El contenido de tioles se expresó en $\mu\text{moles de tioles}/0,5\text{mg de proteína microsómica}$ utilizando como estándar GSH.

Determinación de la actividad GSH-transferásica. La actividad se midió de acuerdo a la técnica espectrofotométrica modificada descrita por Habig y cols., 1974 [38]. La reacción química catalizada por la GSH-transferasa es la siguiente:



La mezcla de reacción contenía (concentraciones finales) en un volumen de 1mL: amortiguador fosfato 0,1M pH 6,5; 1-cloro-2,4-dinitrobenzono 1mM; GSH 4mM; proteína microsómica 0,1mg/mL. El blanco contenía todos los reactivos, a excepción del GSH. La reacción se inició agregando el GSH a la cubeta muestra. La actividad se determinó midiendo la absorbancia del conjugado formado enzimáticamente a 340nm, en forma continua durante 3min a 20°C.

Cabe señalar que con el objeto de minimizar la reacción no enzimática, la reacción se realizó a pH 6,5 y a 20°C; el control no enzimático se utilizó como referencia. La velocidad enzimática se cuantificó utilizando el coeficiente de extinción del conjugado formado: 9,6 mM⁻¹ x cm⁻¹, descrito por Habig y cols., 1974 [38].

Quelación de Cu²⁺. Una solución de CuSO₄ 0,25mM en ausencia y presencia de los extractos herbales en estudio fue sometido a un barrido entre 200 y 800nm, en un espectrofotómetro UV-VIS modelo UV3 acoplado a un computador. El espectro del CuSO₄ 0,25mM se realizó utilizando como referencia, amortiguador fosfato 50mM, pH 7,4. La referencia en el caso de las mezclas CuSO₄/extracto contenía una alícuota del extracto en ensayo diluida en amortiguador fosfato 50mM, pH 7,4.

Análisis estadístico. La expresión de resultados para todos los experimentos se encuentra en el pie de las figuras o las tablas. Los datos presentados corresponden al promedio de al menos 4 experimentos independientes \pm DE. La significancia estadística (t-Student) se realizó usando el software GraphPad Prism 5.0. Las diferencias se consideraron como significativas, cuando $p < 0,05$.

III.RESULTADOS

Contenido de Polifenoles de los extractos de maqui. La Tabla 1 muestra el contenido de polifenoles de los extractos de hojas y frutos de maqui. Independiente de la forma de expresión de los resultados, el contenido de polifenoles del extracto de la hoja del maqui fue significativamente mayor que el del extracto hidroalcohólico del fruto. Así al expresar los resultados como mg equivalentes de catequina /g de extracto de hoja y /mL de extracto de fruto, se observó que el contenido de polifenoles de la hoja era 74,5 veces mayor que el del fruto ($138,2 \pm 9,4$ vs $1,854 \pm 0,02$).

La diferencia observada podría deberse a los diferentes métodos empleados en la preparación de ambos extractos; la hoja es un extracto seco diluido en maltodextrina y el fruto, un extracto hidroalcohólico. Como una forma de eliminar las diferencias debidas a la metodología utilizada en la preparación de ambos extractos y acercar los resultados a las diferencias que existen en el contenido de polifenoles de las hojas y del fruto, los resultados se expresaron como mg equivalentes de catequina/g de droga vegetal. Al utilizar esta forma de expresión esta diferencia disminuyó significativamente, de 74,5 a 12,45 veces mayor el contenido de polifenoles de la hoja en comparación con el fruto ($135,5 \pm 9,3$ vs $10,88 \pm 1,201$). Esta diferencia se mantuvo al expresar los resultados en μ moles equivalentes de catequina/ g de droga vegetal

TABLA N° 1. Contenido de polifenoles de los extractos de maqui

<p>Extracto seco de Hojas de maqui Serie: 019115</p>	<p>138, 2 ± 9,4 mg equivalentes de catequina /g de extracto</p> <p>476 ± 0,031 µmoles equivalentes de catequina /g de extracto</p>	<p>135,5 ± 9,3 mg equivalentes de catequina /g de droga vegetal</p> <p>467± 0,038 µmoles equivalentes de catequina /g de droga vegetal</p>
<p>Extracto hidroalcohólico de Frutos de maqui Serie: 112644</p>	<p>1,85 ± 0,021 mg equivalentes de catequina /mL de extracto</p> <p>6,39 ± 0,021 µmoles equivalentes de catequina /mL de extracto</p>	<p>10,88 ± 1,201 mg equivalentes de catequina /g de droga vegetal</p> <p>37,5 ± 1,6 µmoles equivalentes de catequina /g de droga vegetal</p>

El contenido de polifenoles de los extractos de maqui fue determinado de acuerdo a lo descrito en Métodos. Los valores representan el promedio de al menos 4 experimentos independientes ± DE.

Lipoperoxidación microsómica inducida por el sistema Cu^{2+} /ascorbato en presencia de los extractos de maqui. Como muestra la Figura 1, el extracto de hojas de maqui inhibió la lipoperoxidación microsómica inducida por el sistema Cu^{2+} /ascorbato de una forma concentración-respuesta. La Figura **1A** representa el gráfico directo y la **1B**, el gráfico semilogarítmico del cual se calculó el EC_{50} , valor que representa la concentración de extracto que inhibió la lipoperoxidación en un 50%. Este valor correspondió a 0,51 μg de extracto de hojas/0,5mg de proteína microsómica.

Asimismo la Figura 2 muestra el efecto del extracto de fruto de maqui sobre la lipoperoxidación microsómica inducida por el sistema Cu^{2+} /ascorbato. Este efecto también fue dependiente de la concentración de extracto. La Figura **2A** representa el gráfico directo y la **2B**, el gráfico semilogarítmico del cual se calculó el EC_{50} . En nuestras condiciones de ensayo, este valor correspondió a 0,053 μL de extracto de fruto.

La diferencia de aproximadamente 10 veces en los valores de EC_{50} del extracto de hojas y frutos de maqui, 0,51 μg vs 0,053 μL , respectivamente fue menor que la esperada de las concentraciones respectivas de ambos extractos, 74,5 veces mayor la concentración de polifenoles de la de hojas que la del fruto (Tabla 1). Es por ello que nos interesó expresar estos valores en ηmoles equivalentes de catequina. La Figura 3 muestra los gráficos semilogarítmicos de los cuales se calcularon estos valores. Como se indica en estos gráficos, al expresar los valores de EC_{50} en ηmoles equivalentes de catequina, la diferencia de 10 veces antes observada entre los EC_{50} cambió significativamente; este valor para el extracto de hojas fue 0,25 ηmoles y para el fruto, 0,34 ηmoles , lo cual implica una diferencia aproximada de sólo 1,36 veces. Más aún, al realizar el estudio estadístico, esta diferencia resultó no ser significativa, $p > 0,05$.

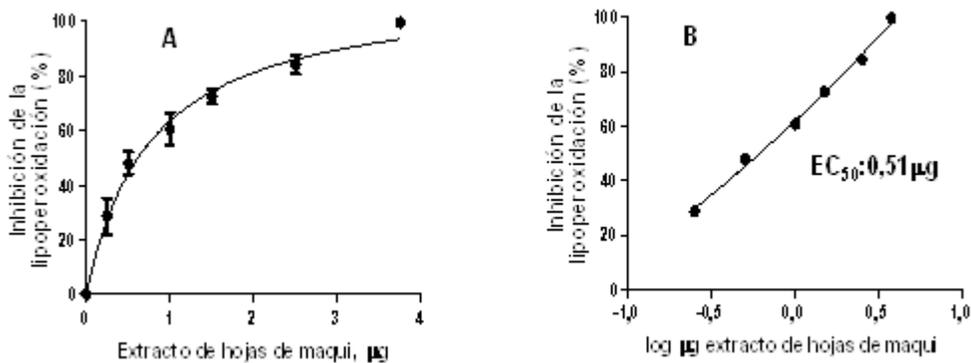


Figura 1: Lipoperoxidación microsómica inducida por Cu^{2+} /ascorbato en presencia del extracto de hojas de maqui. A: Curva concentración-respuesta del efecto del extracto de hojas de maqui sobre la lipoperoxidación microsómica inducida por Cu^{2+} /ascorbato. **B:** Curva semilogarítmica del efecto del extracto de hojas de maqui sobre la lipoperoxidación microsómica inducida por Cu^{2+} /ascorbato. Microsomas 0,5mg/mL fueron incubados durante 5min con distintas concentraciones del extracto de hojas de maqui (0,25-3,75 μg) antes de adicionar el sistema Cu^{2+} /ascorbato para inducir la lipoperoxidación microsómica de acuerdo a lo descrito en Métodos. Los porcentajes de inhibición fueron calculados considerando como 100% el valor de la lipoperoxidación medida en presencia del sistema Cu^{2+} /ascorbato y en ausencia del extracto de hojas de maqui. **EC₅₀:** cantidad de extracto que previno en un 50% la lipoperoxidación microsómica inducida por Cu^{2+} /ascorbato. Los valores representan el promedio de al menos cuatro experimentos independientes \pm D.E.

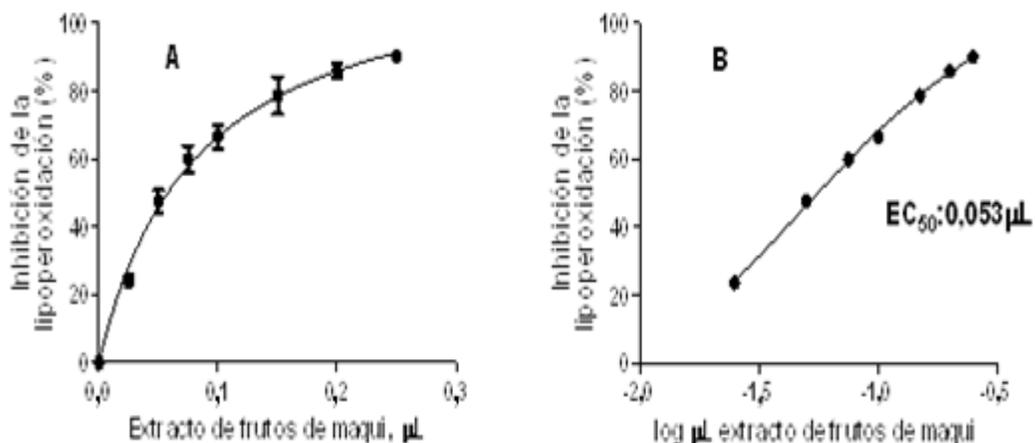


Figura 2: Lipoperoxidación microsómica inducida por Cu²⁺/ascorbato en presencia del extracto de frutos de maqui. **A:** Curva concentración-respuesta del efecto del extracto de frutos de maqui sobre la lipoperoxidación microsómica inducida por Cu²⁺/ascorbato. **B:** Curva semilogarítmica del efecto del extracto de frutos de maqui sobre la lipoperoxidación microsómica inducida por Cu²⁺/ascorbato. Microsomos 0,5mg/mL fueron incubados durante 5min con distintas concentraciones del extracto de frutos de maqui (0,025-0,250μL) antes de adicionar el sistema Cu²⁺/ascorbato para inducir la lipoperoxidación microsómica de acuerdo a lo descrito en Métodos. Los porcentajes de inhibición fueron calculados considerando como 100% el valor de la lipoperoxidación medida en presencia del sistema Cu²⁺/ascorbato y en ausencia del extracto de frutos de maqui. **EC₅₀:** cantidad de extracto que previno en un 50% la lipoperoxidación microsómica inducida por Cu²⁺/ascorbato. Los valores representan el promedio de al menos cuatro experimentos independientes ± D.E.

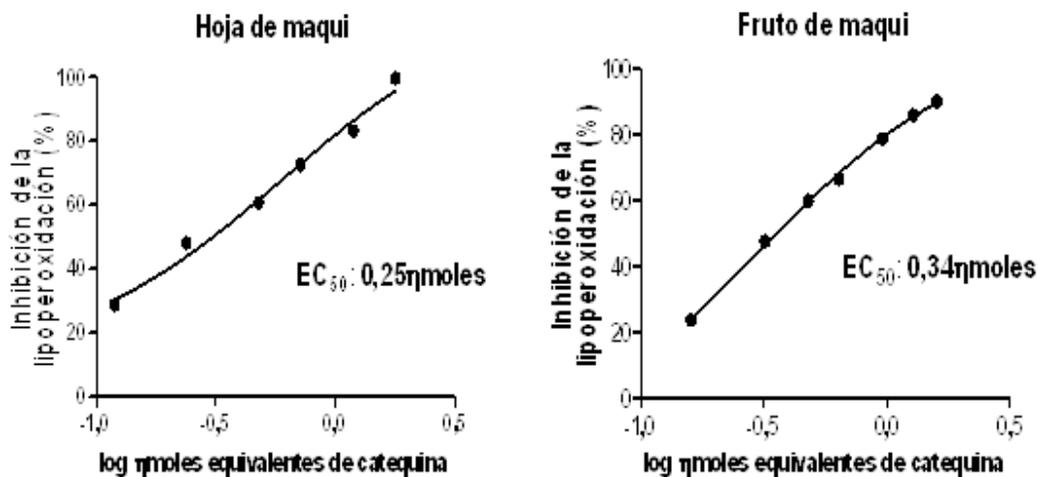


Figura 3. Gráficos semilogarítmicos de la Lipoperoxidación microsómica inducida por Cu^{2+} /ascorbato en presencia de los extractos de hojas y frutos de maqui. Los valores correspondientes a las μ moles equivalentes de catequina fueron calculados a partir de los datos expresados en la Tabla 1 y las Figuras 1 y 2.

Oxidación de tioles microsómicos inducida por el sistema Cu^{2+} /ascorbato en presencia de los extractos de maqui. Como muestra la Figura 4, el extracto de hojas de maqui previno la pérdida de tioles microsómicos inducida por el sistema Cu^{2+} /ascorbato de una forma concentración-respuesta. La Figura **4A** representa el gráfico directo y la **4B**, el gráfico semilogarítmico del cual se calculó el EC_{50} , valor que representa la concentración de extracto que previno la pérdida de tioles microsómicos en un 50%. En nuestras condiciones de ensayo este valor correspondió a $0,91\mu\text{g}$ de extracto de hojas.

Asimismo la Figura 5 muestra el efecto del extracto de fruto de maqui sobre la pérdida de tioles microsómicos inducida por el sistema Cu^{2+} /ascorbato. Este efecto también fue dependiente de la concentración de extracto. La Figura **5A** representa el gráfico directo y la **5B**, el gráfico semilogarítmico del cual se calculó el EC_{50} . Este valor correspondió a $0,25\mu\text{L}$ de extracto de fruto

El EC_{50} del extracto de hojas ($0,91\mu\text{g}$) respecto de aquel de frutos de maqui ($0,25\mu\text{L}$) fue aproximadamente 3,6 veces mayor. Sin embargo, al expresar estos valores en ηmoles equivalentes de catequina el valor para el extracto de hojas fue $0,43\eta\text{moles}$ y para el fruto $1,59\eta\text{moles}$ equivalentes de catequina, lo cual implica una diferencia de aproximadamente 3,6 veces, pero que en este caso el valor mayor favoreció al extracto de frutos de maqui, no a la hoja como en el caso anterior (Figura 6).

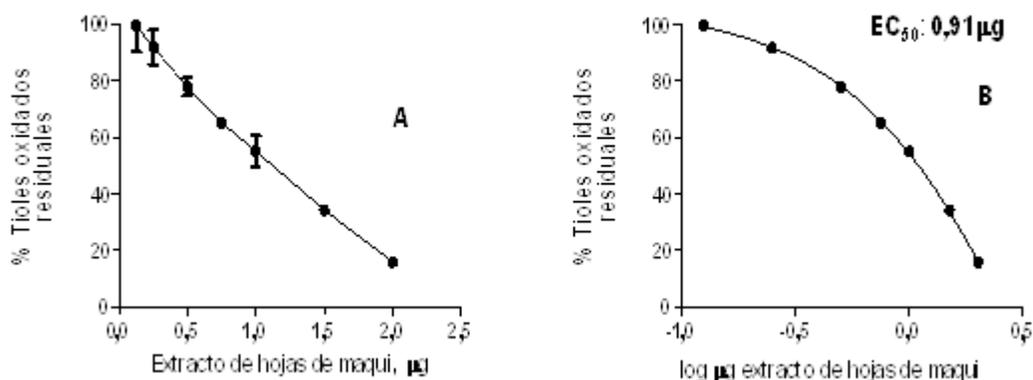


Figura 4. Oxidación de tioles microsómicos inducida por el sistema Cu^{2+} /ascorbato en presencia del extracto de hojas de maqui. A: Curva concentración-respuesta del efecto del extracto de hojas de maqui sobre la oxidación de los tioles microsómicos inducida por Cu^{2+} /ascorbato. **B:** Curva semilogarítmica del efecto del extracto de hojas de maqui sobre la oxidación de los tioles microsómicos inducida por Cu^{2+} /ascorbato. Microsomos 0,5mg/mL fueron incubados durante 5min con distintas concentraciones del extracto de hoja de maqui (0,125-2µg) antes de adicionar el sistema Cu^{2+} /ascorbato para inducir la oxidación de los tioles microsómicos de acuerdo a lo descrito en Métodos. Los porcentajes de tioles oxidados fueron calculados considerando como 100% los tioles microsómicos perdidos en presencia del sistema Cu^{2+} /ascorbato y en ausencia del extracto de hojas de maqui. **EC₅₀:** cantidad de extracto que previno en un 50% la pérdida de tioles microsómicos inducida por Cu^{2+} /ascorbato. Los valores representan el promedio de al menos cuatro experimentos independientes \pm D.E.

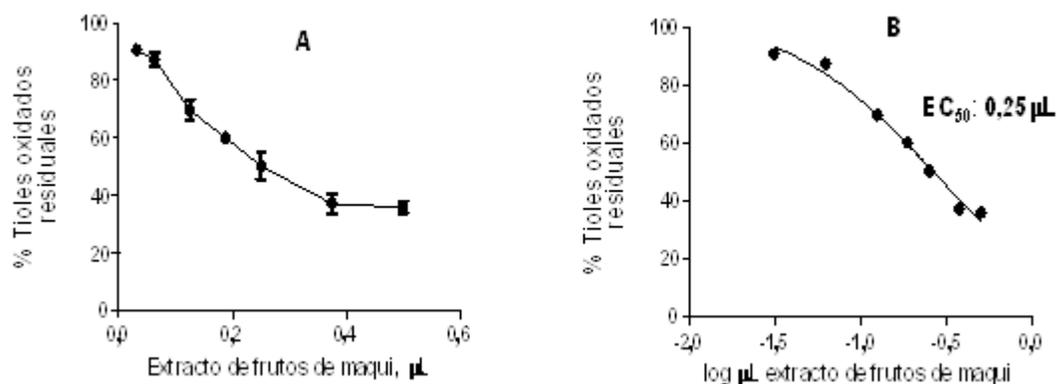


Figura 5. Oxidación de tioles microsómicos inducida por el sistema Cu^{2+} /ascorbato en presencia del extracto de frutos de maqui. **A:** Curva concentración-respuesta del efecto del extracto de frutos de maqui sobre la oxidación de los tioles microsómicos inducida por Cu^{2+} /ascorbato. **B:** Curva semilogarítmica del efecto del extracto de frutos de maqui sobre la oxidación de los tioles microsómicos inducida por Cu^{2+} /ascorbato. Microsomas 0,5mg/mL fueron incubados durante 5min con distintas concentraciones del extracto de frutos de maqui (0,03125-0,5µL) antes de adicionar el sistema Cu^{2+} /ascorbato para inducir la oxidación de los tioles microsómicos de acuerdo a lo descrito en Métodos. Los porcentajes de tioles oxidados fueron calculados considerando como 100% los tioles microsómicos perdidos en presencia del sistema Cu^{2+} /ascorbato y en ausencia del extracto de hojas de maqui. **EC₅₀:** cantidad de extracto que previno en un 50% la pérdida de tioles microsómicos inducida por Cu^{2+} /ascorbato. Los valores representan el promedio de al menos cuatro experimentos independientes \pm D.E.

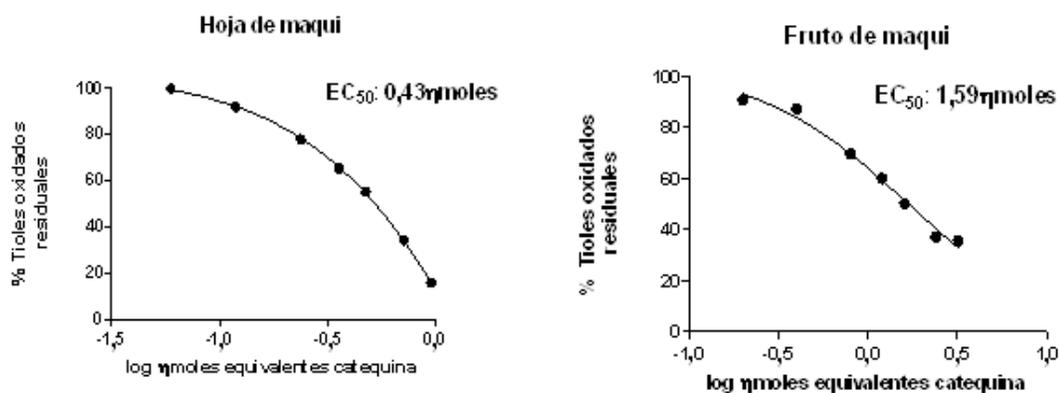


Figura 6. Gráficos semilogarítmicos de la Oxidación de los tioles microsómicos inducida por Cu^{2+} /ascorbato en presencia de los extractos de hojas y frutos de maqui. Los valores correspondientes a las μmoles equivalentes de catequina fueron calculados a partir de los datos expresados en la Tabla 1 y las Figuras 4 y 5.

Los resultados hasta aquí presentados muestran la capacidad de los extractos de hojas y frutos de maqui de prevenir acciones oxidantes sobre los lípidos y tioles proteicos microsómicos. Los antioxidantes mayoritarios de la célula animal están representados por compuestos tiólicos, entre ellos el GSH. Si bien los polifenoles presentes en las hojas de las plantas son los antioxidantes mayoritarios, ellas también poseen compuestos tiólicos antioxidantes [38]. Es por ello nuestro interés en cuantificar, además del contenido de polifenoles, el contenido tiólico de los extractos de maqui, expresados como equivalentes de GSH. La curva estándar de GSH se muestra en la Figura 7; la absorbancia fue lineal entre 25 y 75 μmoles de GSH que fue el rango de concentración de GSH ensayado.

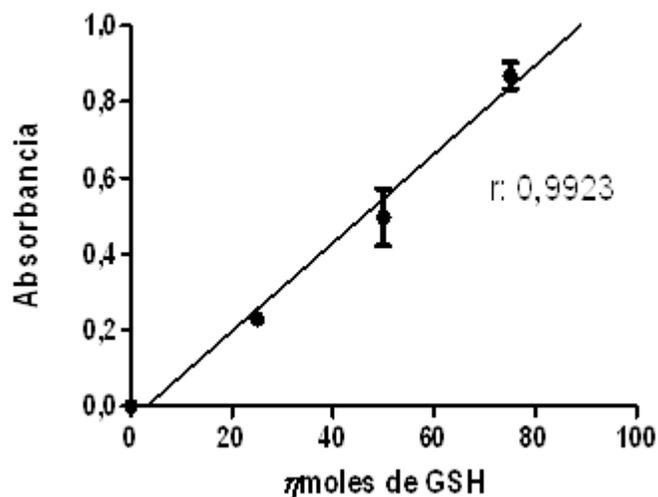


Figura 7. Curva estándar de GSH cuya concentración fue determinada utilizando el método del DTNB. La cuantificación de GSH se determinó cuantificando la concentración de tioles de acuerdo a la técnica descrita en Métodos. Los valores representan el promedio de la menos 4 experimentos independientes \pm DE.

Contenido de tioles de los extractos de maqui. El contenido de tioles del extracto de hojas de maqui expresado como μ moles equivalentes de GSH /g de extracto y /g de droga vegetal no fue significativamente diferente: $47,96 \pm 0,772 \mu\text{mol}$ vs $48,92 \pm 0,772 \mu\text{mol}$, respectivamente; $p > 0,05$ (Tabla 2). Sin embargo, en el fruto los resultados expresados como μ moles equivalentes de GSH /mL de extracto y /g de droga vegetal fueron $1,51 \pm 0,411 \mu\text{mol}$ vs $8,86 \pm 0,411 \mu\text{mol}$, respectivamente; esta diferencia corresponde aproximadamente a 5,9 veces. Cabe señalar además, que al igual que lo visto en el contenido de polifenoles, la hoja de la planta contiene un mayor contenido de tioles que el fruto (Tabla 2). Más aún, la diferencia entre fruto y hoja se disminuye significativamente al expresar los resultados en μ moles equivalentes de GSH/ /g de extracto (hoja) o /mL de extracto (fruto) (31,8 veces), o en μ moles equivalentes de GSH/ g de droga vegetal (5,5 veces).

TABLA 2. CONTENIDO DE TIOLES DE LOS EXTRACTOS DE MAQUI

Extracto seco de Hojas de maqui Serie: 019115	47,96 ± 0,772 μmol equivalentes de GSH /g de extracto	48,92 ± 0,772 μmol equivalentes de GSH /g de droga vegetal
Extracto hidroalcohólico de Frutos de maqui Serie: 112644	1,51 ± 0,411 μmol equivalentes de GSH /mL de extracto	8,86 ± 0,411 μmol equivalentes de GSH/g de droga vegetal

La determinación de los tioles de los extractos se realizó de acuerdo al método descrito en Métodos. Los valores representan el promedio de la menos 4 experimentos independientes ± DE.

Varios de los mecanismos antioxidantes de la célula animal son compartidos por aquellos de la célula vegetal. Así también los polifenoles y los tioles comparten algunos de sus mecanismos antioxidantes. Por ejemplo, polifenoles y tioles son capaces de atrapar radicales libres y quelar metales. Es por ello que para una más fácil comparación, los valores de EC₅₀ obtenidos de la prevención de la oxidación de tioles microsómicos se expresaron como ηmoles equivalentes de catequina y de GSH (Tabla 3). En nuestras condiciones de ensayo los valores de EC₅₀ expresados como ηmoles equivalentes de GSH resultaron ser significativamente menores a aquellos expresados como ηmoles equivalentes de catequina.

TABLA 3. Prevención de la oxidación de tioles microsómicos

VALORES DE EC ₅₀	
Maqui hoja	Maqui fruto
0,43 ηmoles equivalentes de catequina	1,59 ηmoles equivalentes de catequina
0,044 ηmoles equivalentes de GSH	0,38 ηmoles equivalentes de GSH

Los valores de EC₅₀ expresados como ηmoles equivalentes de catequina fueron obtenidos del gráfico semilogarítmico mostrado en la figura 6. Los valores de EC₅₀ expresados como ηmoles equivalentes de GSH fueron obtenidos a partir de la cantidad de extracto correspondiente al EC₅₀ y la curva estándar de GSH.

La oxidación de los tioles en la célula animal, es revertida por compuestos tiólicos, entre ellos el GSH, compuesto antioxidante no enzimático mayoritario de la célula animal. Más aún, este es el principal mecanismo de regulación de los circuitos tiólicos celulares [38]. Interesantemente, ambos extractos fueron capaces de revertir la oxidación de los tioles microsómicos inducida por Cu²⁺/ascorbato (Figura 8). Este efecto fue menor que aquel obtenido de la prevención de la oxidación de los tioles microsómicos. Cabe hacer notar que el contenido de tioles, respecto de aquel de los polifenoles fue significativamente menor en ambos extractos. Más aún, las cantidades ensayadas de cada extracto correspondieron a los EC₅₀ obtenidos de la prevención de la oxidación de los tioles microsómicos y el efecto de reversión de ambos extractos no fue significativamente diferente. $P > 0,05$.

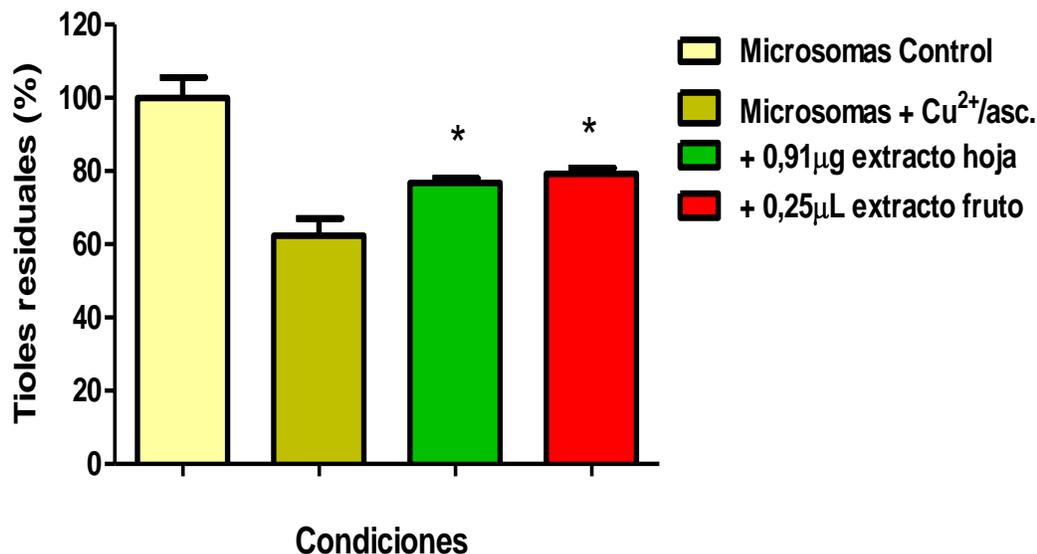


Figura 8. Reversión de la oxidación de los tioles microsómicos inducida por Cu²⁺/ascorbato. Los microsomas fueron preincubados 60min con el sistema Cu²⁺/ascorbato antes de adicionar los extractos y determinar la concentración de tioles residuales de acuerdo a lo descrito en Métodos. Los valores representan el promedio de la menos 4 experimentos independientes \pm DE. * Valor no estadísticamente diferentes, $p > 0,05$.

La actividad biológica de diversas proteínas está asociada al estado redox de sus grupos tiólicos [38,39]. Un ejemplo de estas proteínas es la GSH-transferasa. La forma activa de esta enzima es un dímero –S-S-, si este enlace es reducido a –SH se rompe el dímero y la actividad de esta enzima se pierde. Como una forma de evaluar la capacidad de los tioles herbales de modificar la actividad catalítica de esta enzima, se determinó el efecto de los extractos de maqui sobre la conjugación de 1,4-dinitro-benceno con GSH, reacción catalizada por la GST. Interesantemente, ambos extractos inhibieron la

actividad catalítica de la GST en una extensión similar, aproximadamente 50% (Figura 9); la cantidad del extracto de hoja y de fruto ensayada fue similar: 4,8 y 5,0 η moles equivalentes de GSH, respectivamente. Cabe destacar que el efecto inhibitorio provocado por 1 μ mol de catequina fue aproximadamente sólo 10% y el de 1 μ mol de Ditiotreitól (DTT), aproximadamente 20%, ambos valores inferiores al efecto inhibitorio presentado por los extractos herbales a concentraciones 1000 veces menor.

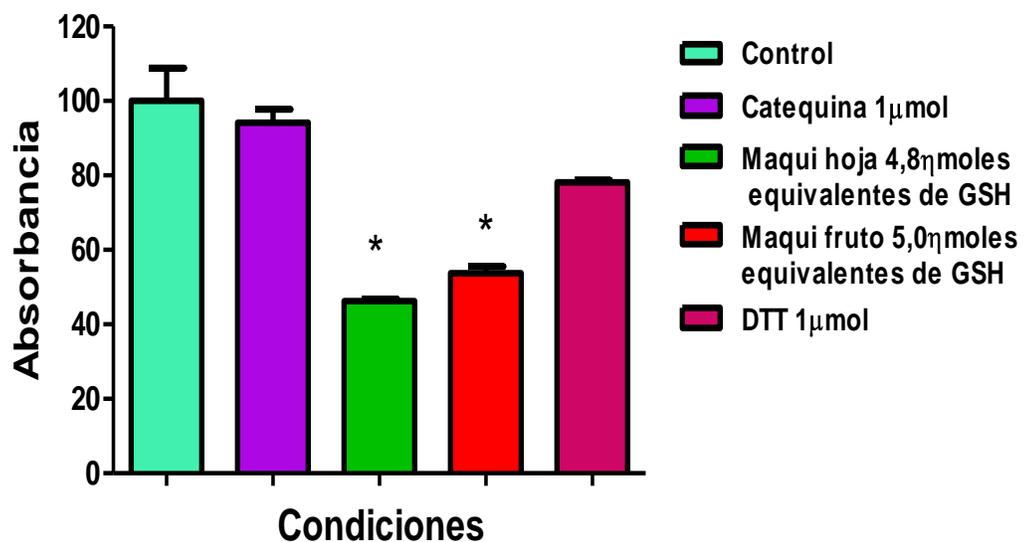


Figura 9. Efecto de los extractos de maqui sobre la actividad catalítica de la GSH-transferasa microsómica. Los valores representan la media de al menos 4 experimentos independientes \pm DE. Esta actividad enzimática fue determinada de acuerdo a lo descrito en Métodos. * Valores no estadísticamente diferentes, $p > 0,05$.

Capacidad quelante de Cu^{2+} de los extractos de maqui. La Figura 10 muestra los espectros de absorbancia del Cu^{2+} realizados en ausencia y presencia de los extractos herbales. Los espectros ubicados a la izquierda corresponden a las mezclas CuSO_4 y extracto herbal; los espectros ubicados a la derecha corresponden a los de los extractos herbales en ausencia de CuSO_4 . El espectro de Cu^{2+} presentó un solo pico de absorbancia máxima a 234nm en el rango de 200 y 800nm . Los espectros de los extractos en ausencia y presencia de CuSO_4 fueron diferentes a los del CuSO_4 . Asimismo, los espectros del extracto de hoja y el de fruto de maqui también fueron diferentes entre sí.

La Figura 11 muestra los espectros de absorbancia del Cu^{2+} realizados en ausencia y presencia de EDTA (1mM), reconocido agente quelante. Como muestra esta Figura, EDTA alteró significativamente el espectro del ión cúprico.

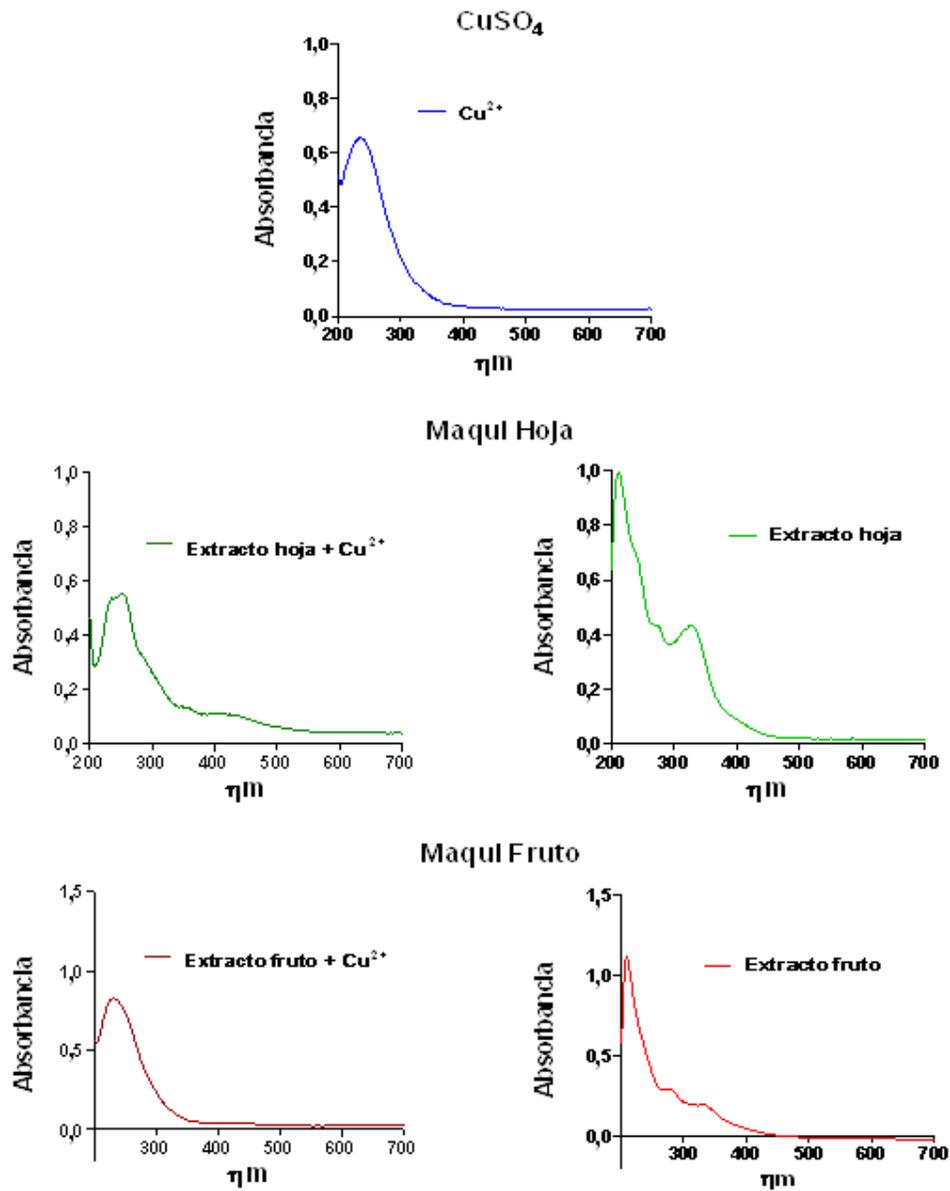
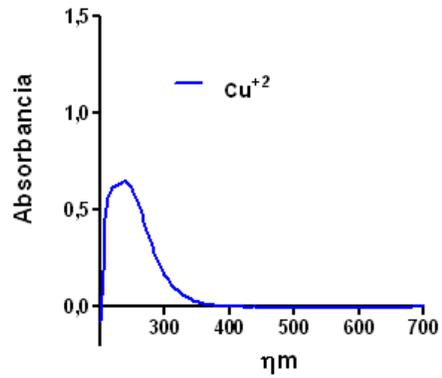


Figura 10. Espectros de absorbancia de Cu²⁺ en presencia y ausencia de los extractos de maqui. Estos espectros fueron realizados de acuerdo a lo descrito en Métodos y corresponden a los obtenidos experimentalmente.

CuSO₄



EDTA

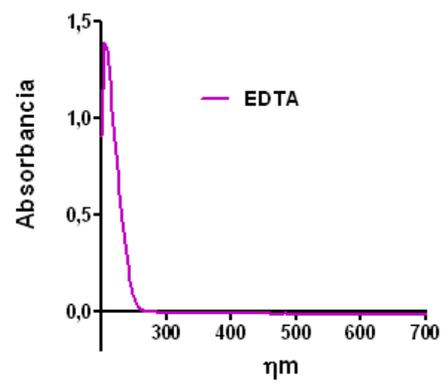
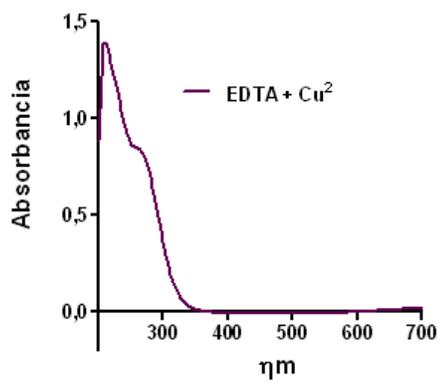


Figura 11. Espectros de absorbancia de Cu²⁺ en presencia y ausencia de EDTA. Estos espectros fueron realizados de acuerdo a lo descrito en Métodos y corresponden a los obtenidos experimentalmente.

IV. DISCUSIÓN

Las propiedades terapéuticas asignadas a los variados preparados herbales que se comercializan actualmente en general son derivadas de la medicina folclórica o de farmacopeas que han sido elaboradas por ejemplo en Estados Unidos o Europa. Como se demostró en este trabajo, la concentración de principios activos presente en un preparado herbal depende de muchas variables que incluyen desde las condiciones de desarrollo de la planta medicinal hasta los procesos involucrados en la generación del preparado herbal a partir de la droga vegetal. De aquí que la metodología utilizada para la elaboración de estos preparados debe estar estandarizada, para así se puedan obtener preparados reproducibles, lo cual asegura la eficacia de los mismos. Más aún, los estudios clínicos realizados con preparados son escasos y por lo mismo fitofármacos aprobados por la FDA son escasísimos. En nuestro trabajo, las hojas y el fruto (droga vegetal) fueron obtenidas de cultivos orgánicos de maqui y los extractos fueron preparados en la empresa farmacéutica Laboratorios Ximena Polanco a través de un proceso de extracción previamente estandarizado.

Los antioxidantes son principios bastante abundantes en todas las plantas, pero su distribución en las diferentes partes de una misma planta es muy diversa. Como se mencionó en la introducción preparados del fruto de maqui se comercializan como fuente de antioxidantes. Esto porque el fruto de maqui, en comparación con otros berries como el fruto de murtila y de arándano, posee una mayor cantidad de antioxidantes. Dado que las hojas constituyen el principal órgano de la planta que la protege de características adversas de su medio ambiente (luz solar, microorganismos, temperatura, disponibilidad de agua, etc.) ellas deberían tener mayores mecanismos defensivos que los demás órganos de la planta. Es por ello que la mayoría de los preparados herbales son elaborados a partir de hojas. Para probar esta diferencia en este

trabajo comparamos el contenido de antioxidantes presentes en el fruto y las hojas de maqui. Nuestros resultados mostraron efectivamente que las hojas de esta planta poseen significativamente mayor cantidad de polifenoles y tioles que son los principales compuestos antioxidantes de las plantas.

Más aún, es necesario poseer métodos estandarizados para evaluar las distintas actividades que se proponen evaluar. Esta estandarización debe incluir el máximo posible de acercamiento a las condiciones fisiológicas cuando se trata de evaluaciones *in vitro*. Comúnmente la metodología utilizada para evaluar la capacidad antioxidante de preparados herbales usa como sistema oxidante, radicales libres sintéticos nitrogenados estables y los radicales libres celulares mayoritarios son derivados del oxígeno molecular y además son muy inestables, su vida media es de mseg [40]. Esto ya dice que existe una gran diferencia en su reactividad entre las especies oxidantes sintéticas y las biológicas. Por otra parte, la ocurrencia de una reacción redox depende de la diferencia de potencial entre oxidante y antioxidante o reductor. Por lo tanto, es importante utilizar moléculas biológicas (proteínas, lípidos, etc.) para determinar la capacidad de los antioxidantes de protegerlas de su oxidación patológica. La generación de especies oxidantes en la célula está regulada por la capacidad antioxidante celular la cual se expresa a través de distintos mecanismos enzimáticos y no enzimáticos, manteniendo así un equilibrio entre la concentración de especies oxidantes y antioxidantes. Esto porque las especies oxidantes derivadas ya sea del oxígeno y del nitrógeno (NO) cumplen funciones fisiológicas; cuando se desregula su síntesis, se rompe el equilibrio y se produce un desbalance entre estas especies generándose estrés oxidativo, fenómeno que caracteriza en mayor o menor grado a todas las patologías.

De lo anterior se deduce que la diferencia en la capacidad antioxidante de los extractos de hojas y frutos de maqui frente a las biomoléculas, se debería en parte a la diferencia en el contenido y propiedades fisicoquímicas de los tipos

de antioxidantes que ellos poseen, como también a los potenciales redox individuales de las biomoléculas ensayadas. Cabe señalar además que las biomoléculas poseen distintos grupos funcionales; cada uno de ellos se enfrenta a un antioxidante con distinta reactividad. Así por ejemplo, en una proteína los grupos tiólicos son más reactivos frente a especies oxidantes que los grupos amino, por lo tanto, se oxidan más fácilmente en presencia de EROs. Asimismo, los lípidos de las membranas celulares, al estar más expuestos a los oxidantes citosólicos, se oxidan más fácilmente que las proteínas insertas en dichas membranas.

Los antecedentes y resultados presentados nos permiten afirmar que no se puede generalizar respecto de la acción antioxidante de distintos preparados herbales, como tampoco, respecto de su eficacia frente a una determinada acción benéfica ya sea preventiva o curativa. Disponer de extractos estandarizados para la formulación de fitofármacos que nos permitan realizar estudios *in vivo*, aseguran su eficacia, seguridad y posología.

CONCLUSIONES

- El contenido de polifenoles y de tioles del extracto de hojas fue significativamente mayor que el de frutos de maqui. Asimismo, la acción antioxidante evaluada por la capacidad de prevenir la oxidación de los lípidos y los tioles microsómicos del extracto de hojas fue mayor que el de frutos de maqui.
- La participación de agentes antioxidantes, especialmente tiólicos, en la regulación de la actividad de distintas proteínas quedó demostrada al ensayar la actividad de la GST microsómica; la actividad de esta enzima fue inhibida por ambos extractos. Interesantemente, este efecto inhibitorio provocado por catequina y ditioneitol (DTT) fue significativamente menor al de los extractos; se necesitaron μ moles de ambos compuestos en comparación con las η moles equivalentes de GSH de los extractos para obtener un efecto similar.
- La acción antioxidante biológica de los extractos puede ocurrir a través de diferentes mecanismos que incluyen la inhibición de la generación de EROS, como es la quelación de metales de transición.

V. REFERENCIAS

- [1] Benzie IF (2000) Evolution of antioxidant defence mechanisms. *Eur J Nutr* 39: 53-61.
- [2] Deneke SM (2000) Thiol-based antioxidants. *Curr Top Cell Regul* 36: 151-180.
- [3] Letelier ME , López-Valladares M, Peredo-Silva L, Rojas-Sepúlveda D, Aracena P (2011) Microsomal oxidative damage promoted by acetaminophen metabolism. *Toxicology in Vitro* 25 (2011) 1310–1313.
- [4] Letelier ME Faúndez M, Jara-Sandoval J, Molina-Berríos A, Cortés-Troncoso J, Aracena-Parksa P, Marín-Catalán R (2009a) Mechanisms underlying the inhibition of the cytochrome P450 system by copper ions. *Journal of Applied Toxicology* 29 (8) 696 - 702.
- [5] De Gara L, Locato V, Dipierro S, de Pinto MC (2010) Redox homeostasis in plants. The challenge of living with endogenous oxygen production. *Respir Physiol Neurobiol* 173 Suppl: S13-19.
- [6] Kornas A, Kuzniak E, Slesak I, Miszalski Z (2010) The key role of the redox status in regulation of metabolism in photosynthesizing organisms. *Acta Biochim Pol* 57: 143-151.
- [7] Shao HB, Chu LY, Shao MA, Jaleel CA, Mi HM (2008) Higher plant antioxidants and redox signaling under environmental stresses. *C R Biol* 331: 433-441.
- [8] Bors W, Michel C (2002) Chemistry of the antioxidant effect of polyphenols. *Ann N Y Acad Sci* 957: 57-69.

- [9] Fraga CG, Galleano M, Verstraeten SV, Oteiza PI (2010) Basic biochemical mechanisms behind the health benefits of polyphenols. *Mol Aspects Med* 31: 435-445.
- [10] Sies H (2010) Polyphenols and health: update and perspectives. *Arch Biochem Biophys* 501: 2-5.
- [11] Schafer FQ, Buettner GR (2001) Redox environment of the cell as viewed through the redox state of the glutathione disulfide/glutathione couple. *Free RadicBiol Med* 30: 1191-1212.
- [12] Wu G, Fang YZ, Yang S, Lupton JR, Turner ND (2004) Glutathione metabolism and its implications for health. *J Nutr* 134: 489-492.
- [13] Wouters MA, Fan SW, Haworth NL (2010) Disulfides as redox switches: from molecular mechanisms to functional significance. *Antioxid Redox Signal* 12: 53-91.
- [14] Brosnan JT and Brosnan ME (2008) Glutathione and the Sulfur-Containing Amino Acids: An Overview, in *Glutathione and Sulfur Amino Acids in Human Health and Disease* (eds R. Masella and G. Mazza), John Wiley & Sons, Inc., Hoboken, NJ, USA. doi: 10.1002/9780470475973.ch1
- [15] Banerjee R (2008) *Redox biochemistry*. Wiley-Interscience, Hoboken, N.J. A John Wiley & Sons, Inc., Publication.
- [16] Jones DP (2008) Radical-free biology of oxidative stress. *Am J Physiol Cell Physiol* 295: C849-868.
- [17] Newcomb M, Chandrasena RE (2005) Highly reactive electrophilic oxidants in cytochrome P450 catalysis. *Biochem Biophys Res Commun* 338: 394-403.

- [18] Klaassen CD, Reisman SA (2010) Nrf2 to the rescue: effects of the antioxidative/electrophilic response on the liver. *Toxicol Appl Pharmacol* 244: 57-65.
- [19] Lian-Sai Chia (2003) Analysis and biological activities of anthocyanins. *Phytochemistry* 64: 923-933.
- [20] Nohynek LJ (2006) Berry phenolics: antimicrobial properties and mechanisms of action against severe human pathogens. *Nutrition and cancer* 54: 18–32.
- [21] Kuskoski EM (2004) Actividad antioxidante de pigmentos antociánicos. *Ciencia e Tecnologia de Alimentos* 24: 691–693.
- [22] Ruiz A, Hermosín-Gutiérrez I (2010) Polyphenols and antioxidant activity of calafate (*Berberis microphylla*) fruits and other native berries from Southern Chile. *J Agr Food Chem* 58: 6081–6089.
- [23] Bouzid W, Zoughlache SD (2009) Antibacterial Activity of Some Fruits ; Berries and Medicinal Herb Extracts Against Poultry Strains of Salmonella. *American-Eurasian J. Agric. & Environ. Sci* 6: 12–15.
- [24] Toivanen M, Huttunen S (2011) Inhibition of adhesion of *Neisseria meningitidis* to human epithelial cells by berry juice polyphenolic fractions. *Phytother Res* 25: 828–832.
- [25] Huttunen S, Toivanen M (2011) Inhibition activity of wild berry juice fractions against *Streptococcus pneumoniae* binding to human bronchial cells. *Phytother Res* 25: 122–127.
- [26] Mølgaard P, Holler J. G (2011) Antimicrobial evaluation of Huilliche plant medicine used to treat wounds. *J Ethnopharmacol* 138: 219–227.

- [27] Escribano-Bailón MT, Alcalde-Eon C, Muñoz O, Rivas-Gonzalo J C, Santos-Buelga C (2006) Anthocyanins in berries of Maqui [*Aristotelia chilensis* (Mol.) Stuntz]. *Phytochem Anal* 17: 8–14.
- [28] Avello M, Valdivia R. Actividad de *Ugni molinae* Turcz frente a microorganismos de importancia clínica. *Bol Latinoam Caribe Plant Med Aromat* 2: 141-144.
- [29] Burdulis D, Sarkinas A (2009) Comparative study of anthocyanin composition, antimicrobial and antioxidant activity in bilberry (*Vaccinium myrtillus* L.) and blueberry (*Vaccinium corymbosum* L.) fruits. *Acta Poloniae Pharmaceutica - Drug Research* 66: 399–408.
- [30] Shene C, Reyes AK (2008) Plant location and extraction procedure strongly alter the antimicrobial activity of murta extracts. *Eur Food Res Techn* 228: 467–475.
- [31] Schreckinger ME, Wang J (2010) Antioxidant Capacity and in Vitro Inhibition of Adipogenesis and Inflammation by Phenolic Extracts of *Vaccinium floribundum* and *Aristotelia chilensis*. *J Agr Food Chem* 58: 8966–8976.
- [32] Céspedes C (2008) Antioxidant and cardioprotective activities of phenolic extracts from fruits of Chilean blackberry *Aristotelia chilensis* (Elaeocarpaceae), Maqui. *Food Chem* 107: 820-829
- [33] Letelier ME (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: 203–211.
- [34] Lowry OH (1951) Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem* 265–275.

- [35] Letelier ME, Cortés JF, Lepe AM, Jara JA, Molina-Berrios A, Rodríguez C, Iturra-Montecinos P, Faúndez M (2009b) Evaluation of the antioxidant properties and effects on the biotransformation of commercial herbal preparations using rat liver endoplasmic reticulum. *Boletín Latinoamericano y del Caribe de Plantas Medicinales y Aromáticas* Vol. 8 (2) 110 -120.
- [36] Aracena P, Lazo-Hernández C, Molina-Berrios A, Sepúlveda DR, Reinoso C, Larraín JI, Navarro J, Letelier ME (2014) Microsomal oxidative stress induced by NADPH is inhibited by nitrofurantoin redox biotransformation. *Free Radical Research* 48 (2) 129 -136.
- [37] Letelier ME, Lepe AM, Faúndez M, Salazar J, Marín R, Aracena, H. Speisky P (2005) Possible mechanisms underlying copper-induced damage in biological membranes leading to cellular toxicity. *Chemico-Biological Interactions* 15 71 - 82.
- [38] Habig W, Pabst M, Jakoby W (1974) Glutathione S-Transferases: The first enzymatic step in mercapturic acid formation. *J Biol Chem* Nov 25;249 (22):7130-9.
- [39] Letelier ME, Gallardo-Garrido C, Villar-Bustamante CL, Díaz- Véliz G (2015) Relationship between antioxidant and anxiolytic activity of standardized extracts of *Melissa officinalis* and *Rosmarinus officinalis*. *International Journal of Phytomedicine* 7 343 – 353.
- [40] Letelier ME, Molina-Berrios A, Cortes-Troncoso J, Jara-Sandoval J, Holst M, Palma K, Montoya M, Miranda D, Gonzalez-Lira V (2008) DPPH and oxygen free radicals as pro-oxidant of biomolecules. *Toxicology In Vitro* 22(2):279-286.