



**Universidad de Chile**  
**Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas**  
**Departamento de Química Farmacológica y Toxicológica**  
**Laboratorio de Productos Naturales**

**EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE DE EXTRACTOS  
METANÓLICOS DE *Quinchamalium chilense* y *Adesmia boronioides***

PROFESORA PATROCINANTE

Dra. Carla Delporte Vergara  
Depto. De Química Farmacológica y  
Toxicológica

DIRECTORES DE MEMORIA

Dra. Carla Delporte Vergara  
Dra. Consuelo Castro

**MEMORIA PARA OPTAR AL TÍTULO DE QUÍMICO FARMACÉUTICO**

**PAMELA ALEJANDRA VILLARROEL LIZANA**

**Santiago, Chile**

**2017**

## Agradecimientos

En primer lugar debo agradecer a Dios por la hermosa familia que me ha regalado y por todas las oportunidades que se me han dado.

Agradecer a mis padres Ismael Antonio Villarroel Burgos y Elsa Rosa Lizana Pino y a mi hermana Carol Andrea Villarroel Lizana, por todo el cariño y apoyo entregado durante todos estos años en la facultad, por su amor incondicional, por tener siempre una palabra de ánimo y guiarme en el camino de la vida. Por permitirme desarrollarme como persona y en lo académico. Preocupados siempre de que pueda alcanzar mis metas.

A la profesora Carla Delporte por la oportunidad de desarrollar esta tesis en el Laboratorio de Productos Naturales, por su comprensión, por su apoyo y por ser la guía de este trabajo.

A todos mis compañeros del laboratorio Consuelo Castro, Gabriela Valenzuela, Marcelo Peña, Jorge Arancibia, Paula Valenzuela, Rodrigo Pérez, Diana Figueroa, Ítalo Bugueño, Daniela Jara y Catalina Figueroa, por el apoyo brindado, por los buenos momentos que pasamos juntos, gracias.

A mis amigas durante este largo camino Daniela Pereira y Andrea Méndez por todo lo vivido en estos años de facultad, las alegrías que pasamos juntas, por los buenos momentos.

## Índice general

### Contenido

INDICE DE ILUSTRACIONES .....	<u>III</u>
INDICE DE TABLAS .....	<u>IV</u>
INDICE DE ANEXOS .....	<u>V</u>
ABREVIATURAS.....	<u>VI</u>
RESUMEN .....	<u>VII</u>
ABSTRACT .....	<u>IX</u>
I.- INTRODUCCIÓN .....	1
II.- HIPÓTESIS.....	7
III.- OBJETIVOS.....	7
3.1. Objetivos generales.....	7
3.2. Objetivos específicos.....	7
CAPÍTULO IV ANTECEDENTES GENERALES.....	8
4.1.1. Clasificación taxonómica Quinchamali.....	8
4.1.2. Distribución geográfica Quinchamali .....	8
4.1.3. Descripción botánica Quinchamali .....	8
4.2.1. Clasificación taxonómica Adesmia boroniodes.....	9
4.2.2. Distribución geográfica Adesmia boroniodes .....	9
4.2.3. Descripción botánica Adesmia boroniodes .....	9
CAPÍTULO V MATERIALES Y METODOS .....	10
5.1. Reactivos .....	10
5.2. Material vegetal .....	10
5.2.1. Recolección .....	10
5.3 Obtención de los extractos.....	13

5.4. Estudios farmacológicos <i>in vitro</i> .....	14
5.4.1. Ensayo de poder reductor de Fe <sup>+3</sup> (FRAP).....	14
5.4.2. Apagamiento del radical DPPH.....	14
5.4.3. Determinación de la inhibición de la enzima xantina oxidasa.....	17
5.4.4. Determinación del atrapamiento de anión superóxido .....	19
5.4.5. Ensayo de poder reductor de Cu <sup>+2</sup> (CUPRAC) .....	25
5.4.6. Análisis estadístico .....	26
RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	28
6.1 Estudios farmacológicos <i>in vitro</i> .....	27
6.1.1. Poder reductor de Fe <sup>+3</sup> .....	27
6.1.2. Cinética de apagamiento del radical DPPH .....	29
6.1.3. Determinación de la inhibición de la enzima xantina oxidasa y atrapamiento de anión superóxido.....	33
6.1.4. Poder reductor de Cu <sup>+2</sup> .....	36
Conclusiones .....	39
Referencias bibliograficas .....	42

## INDICE DE ILUSTRACIONES

FIGURA 1: Fotografía de <i>Quinchamalium chilense</i> Mol. (Quinchamali).....	1
FIGURA 2: Fotografía de <i>Adesmia boronioides</i> Hook. (Paramela) .....	2
FIGURA 3: Compuestos aislados de <i>Quinchamalium chilense</i> . .....	4
FIGURA 4: Compuestos aislados de <i>Adesmia boronioides</i> .....	4
FIGURA 5: Proceso de preparación de los extractos de <i>Q. chilense</i> y <i>A. boronioides</i> .....	13
FIGURA 6: Estructura del complejo $Fe^{+3}$ - TPTZ y su forma ferrosa.....	14
FIGURA 7: Estructura y esquema de reacción de apagamiento del radical DPPH .....	16
FIGURA 8: Estructura del azul 2,2,-dinitro- tetrazolio ( $NBT^{+2}$ ) .....	21
FIGURA 9: Estructura del diformazán (DF).....	24
FIGURA 10: Estructura del complejo $Cu^{+1}$ - neocuproina .....	26
FIGURA 11: Curva de calibración con Trolox (5-24 $\mu M$ ) .....	28
FIGURA 12: Cinética de apagamiento del radical DPPH de extractos de <i>Q. chilense</i> .....	30
FIGURA 13: Grafico %DPPH remanente de Trolox y los extractos de <i>Q. chilense</i> .....	31
FIGURA 14: Curva calibración Trolox (20-39 $\mu M$ ).....	34

## INDICE DE TABLAS

TABLA 1: Protocolo poder reductor de Fe <sup>+3</sup> .....	15
TABLA 2: Protocolo cinetica de apagamiento del radical DPPH.....	16
TABLA 3: Protocolo para medición de actividad inhibitoria sobre Xantina oxidasa .....	19
TABLA 4: Protocolo para medición de apagamiento de radical superoxido .....	22
TABLA 5: Protocolo poder reductor de Cu <sup>+2</sup> .....	24
TABLA 6: Valores FRAP de los extractos metanólicos de <i>Q. chilense</i> y <i>A. boronioides</i> .....	27
TABLA 7: Parámetros cinéticos CE <sub>50</sub> , TE <sub>50</sub> y eficiencia antioxidante de los extractos metanólicos de <i>Q. chilense</i> y <i>A. boronioides</i> . .....	42
TABLA 8: Porcentaje de inhibición de xantina oxidasa y cantidades relativas de ácido úrico en presencia de alopurinol a diferentes concentraciones .....	33
TABLA 9: Porcentaje de inhibición de xantina oxidasa y cantidades relativas de ácido úrico en presencia de los extractos de <i>Q. chilense</i> y <i>A. boronioides</i> .....	34
TABLA 10: Porcentaje de apagamiento del anión superóxido y cantidades relativas de este compuesto en presencia de los extractos de <i>Q. chilense</i> y <i>A. boronioides</i> .....	45
TABLA 11: Valores CUPRAC de los extractos metanólicos de <i>Q. chilense</i> y <i>A. boronioides</i> .....	37
TABLA 12: Resumen resultados de los diferentes ensayos para los dos extractos evaluados.....	40

## INDICE DE ANEXO

### ANEXO 1: RESUMEN PRESENTACION ORAL CONGRESO

“Evaluación de la capacidad antioxidante del extracto metanólico de las partes aéreas de *Quinchamalium chilense*”. 2° Congreso Latinoamericano de Plantas Medicinales Universidad de Santiago (USACH)

### Anexo 2: PUBLICACION REALIZADA

“Antioxidant activity of Selected Chemical Constituents of *Quinchamalium chilensis*”.

## ABREVIATURAS

SET: mecanismo antioxidante de transferencia de un electrón

Trolox: ácido 6-hidroxi-2, 5, 7,8-tetrametilcroman-2-carboxílico

DPPH: 2,2-difenil-1-picrilhidrazilo

FRAP: ensayo de poder reductor de  $\text{Fe}^{+3}$

CUPRAC: ensayo de poder reductor de  $\text{Cu}^{+2}$

XO: enzima xantina oxidasa

X: xantina

$\text{CuCl}_2$ : cloruro de cobre (II)

TPTZ: tripiridiltriazina

Nc: neocuproina

EDTA: ácido etildiaminotetraacético

$\text{FeCl}_3$ : tricloruro férrico

$\lambda$ : longitud de onda

HCl: ácido clorhídrico

NBT: cloruro de nitroazul de tetrazolio

MF: monoformazán

DF: diformazán

EMQ1: extracto metanólico de *Q. chilense*

EMQ2: réplica del extracto metanólico de *Q. chilense*

EMAB1: extracto metanólico de *A. boronioides*

EMAB2: réplica del extracto metanólico de *A. boronioides*

## Resumen

Esta memoria tuvo como objetivo evaluar la capacidad antioxidante de las partes aéreas de *Quinchamalium chilense* y las hojas de *Adesmia boronioides*, para contribuir al conocimiento farmacológico de estas especies autóctonas. Para esto se obtuvieron los extractos seriados con solventes de polaridad creciente: hexano, diclorometano y metanol. Siendo estudiado el extracto metanólico (EM) en este estudio por su mayor contenido de compuestos fenólicos, metabolitos secundarios con demostrada actividad antioxidante.

Para evaluar la actividad antioxidante *in vitro*, se utilizaron distintos métodos como i) FRAP (poder reductor de  $\text{Fe}^{+3}$ ), ii) CUPRAC (poder reductor de  $\text{Cu}^{+2}$ ), iii) apagamiento del radical DPPH, iv) neutralización del radical anión superóxido ( $\text{SO}^{\cdot-}$ ) generado mediante el sistema xantina - xantina oxidasa y porcentaje de inhibición de la actividad de la xantina oxidasa (XO) de los EMs de ambas especies. En los ensayos FRAP y CUPRAC, los resultados fueron expresados como equivalentes Trolox/ g extracto seco. En el ensayo DPPH los resultados fueron expresados como la concentración efectiva cincuenta ( $\text{CE}_{50}$ ), tiempo efectivo cincuenta ( $\text{TE}_{50}$ ) y eficiencia antioxidante (EA), la sustancia de referencia fue Trolox. En el ensayo de Inhibición de Xo los resultados se expresaron como porcentaje de inhibición de la enzima, el compuesto de referencia fue alopurinol y en el de neutralización del radical anión superóxido

se expresaron como porcentaje de disminución de este anión radical; en este caso el compuesto de referencia fue quercetina.

Los resultados indican que el EM de *Q. chilense* (QM) presentó una mayor actividad antioxidante en todos los ensayos realizados respecto del EM de *A. boronioides* (ABM), éste último mostró actividad en todos los ensayos excepto en el método de apagamiento del radical DPPH.

## ABSTRACT

The aim of this report was to evaluate the antioxidant capacity of the aerial parts of *Quinchamalium chilense* and *Adesmia boronioides* leaves in order to contribute to the pharmacological knowledge of these native species. For this, serial extracts were obtained with increasing polarity solvents: hexane dichloromethane and metanol. Being studied the methanol extract by its higher content of phenolic compounds, secondary metabolites with proven antioxidant activity

FRAP method of reducing power CUPRAC  $\text{Fe}^{+3}$  and  $^{+2}$  reducing power of Cu was used to evaluate the antioxidant activity in vitro, the results are expressed as Trolox / g dry matter equivalent. Furthermore scavenging DPPH radical used observing a decrease in absorbance whose result is expressed as the effective concentration fifty ( $\text{EC}_{50}$ ) and effective time fifty ( $\text{ET}_{50}$ ) which allows for the antioxidant efficiency (AE) and its action against radical superoxide anion ( $\text{SO}\cdot^-$ ) system generated by xanthine - xanthine oxidase. Finally the percent inhibition exerted on the enzyme samples Xanthine oxidase (XO) was evaluate

## I.- INTRODUCCIÓN

*Quinchamalium chilense* Mol., n. v. quinchamalí, Santalaceae, es una hierba siempre verde que se encuentra distribuida geográficamente entre la I Región de Tarapacá y la XI Región de Aysén del General Carlos Ibáñez del Campo en Chile, además de Argentina y Bolivia (Simirgiotis et al, 2012). La otra especie en estudio *Adesmia boronioides* Hook, n.v paramela, Fabaceae es un arbusto que se encuentra distribuido en Chile y Argentina (Ulibarri y Bulkart, 2000).



FIGURA 1: Parte aérea de *Quinchamalium chilense* Mol. (n.v.: Quinchamalí) (Ulibarri y Bulkart, 2000).



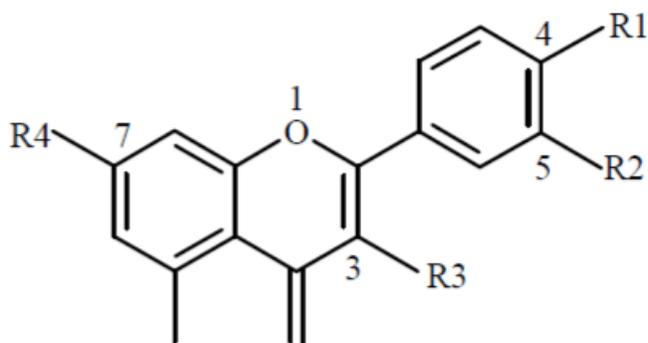
FIGURA 2: Parte aérea de *Adesmia boronioides* Hook. (n.v.paramela) (Aquino et al, 2015).

La medicina folclórica le atribuye a quinchamalí una serie de propiedades medicinales. Las comunidades Mapuches del sur de Chile, utilizan el decocto de las partes aéreas endulzado con miel de abeja contra los abscesos hepáticos, con este fin el decocto se ingiere por las mañanas. La infusión de las partes aéreas de la planta se emplea también como depurativa, emenagoga y durante la convalecencia de caídas y golpes. La compresa humedecida con el decocto o la infusión se aplica sobre las heridas como cicatrizante (Aquino et al, 2015). Mientras que la paramela se emplea contra el dolor estomacal y en metrorragias, los campesinos le atribuyen propiedades afrodisíacas. Se usa como "sahumerio" para las vías respiratorias y como digestiva. También es utilizada en primavera como forraje para los caballos. La Infusión de las hojas se utiliza para cálculos renales, vejiga, y enfriamientos, como depurativa, para eliminar grasa y gases, "enfriamiento estomacal", tos y resfríos; analgésico y

antiespasmódico y en vahos para la cistitis. La planta completa se usa para el reumatismo (González et al, 2004).

Estudios previos referentes a la composición química de *Q. chilense* han revelado la presencia de varios triterpenos, esteroides y flavonoides, como el ácido betulínico, daucosterol, 5,7-dihydroxiflavona, ácido oleanólico, pinocembrina y ácido ursólico (Gua et al., 2004), mucilagos, taninos, saponinas (Muñoz et al., 2004). El estudio químico de la infusión de *Q. chilense* permitió demostrar que este extracto acuoso contiene 14 glucósidos de canferol, quercetina y apigenina (Simirgiotis et al, 2012). En un estudio de Muñoz et al (2014), se aislaron e identificaron cinco nuevos glucósidos de flavonoides, derivados de quercetina y canferol además de pinocembrósido.

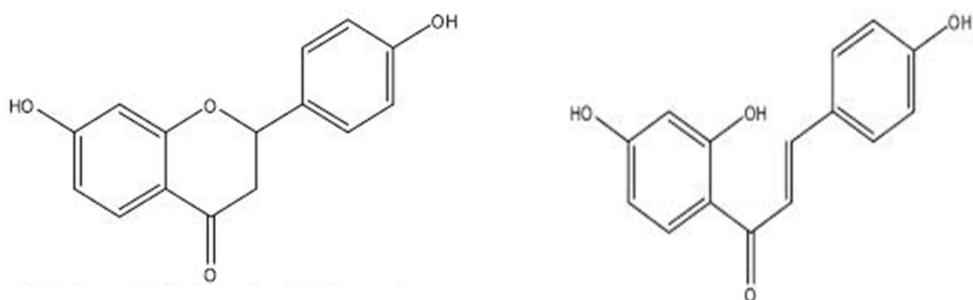
Respecto del género *Adesmia*, hay estudios en diferentes especies que demuestran la presencia de flavonoides, triterpenos y glucósidos de triterpenos. Se ha determinado que: quercetina, isovitexina, isoramnetina-3-O-rutinósido, pinitol y ácido clorogénico, se encuentran en *Adesmia aegiceras* Phil. (Agnese et al, 2001). En distintas especies de *Adesmia*, se han identificado canferol, canferol-3,7-O-diramnósido y canferol-7-neohesperidósido (Simirgiotis et al., 2012).



	R1	R2	R3	R4
1	OH	OH	O-β-D-gluc-(1→2)-[α-L-rha-(1→6)]-β-D-gluc	OH
2	OH	H	O-β-D-gluc-(1→2)-[α-L-rha-(1→6)]-β-D-gluc	OH
3	OH	OH	O-xylosyl-(1→2)-[α-L-rha-(1→6)]-β-D-gluc	OH
4	OH	OH	O-α-L-rha-(1→6)-β-D-glucopyranosyloxy	OH
5	H	H	H	β-D-gluc

gluc = glucopyranosyl; rha = rhamnopyranosyl

Figura 3: Compuestos aislados de *Quinchamalium chilense* (Aquino et al, 2015)



7-Hidroxi-2-(4 hidroxifenil)-croman-4-ona

E-1-(2,4-dihidroxifenil)-3-(4-hidroxifenil) prop-2-en-1-ona

Figura 4: Compuestos aislados de *Adesmia boronioides*

Estudios previos relativos a la actividad farmacológica de *Q. chilense* muestran que el extracto de diclorometano de las raíces y partes aéreas presenta actividad contra *Mycobacterium tuberculosis*, con una concentración mínima inhibitoria de 50 µg/ml (Gu et al, 2004)

Por otro lado, respecto de estudios previos de *A. boronioides*, se ha demostrado la propiedad antiinflamatoria del aceite esencial de esta especie, así como del extracto metanólico y del extracto acuoso. Los dos primeros resultaron ser potentes inhibidores de la generación de leucotrieno B<sub>4</sub> al contrario de lo que sucede con el extracto acuoso que resulto inactivo. El aceite esencial redujo la producción del leucotrieno B<sub>4</sub> en un porcentaje mayor al 50 % a una concentración de 15 µg/ml, mientras que el extracto metanólico redujo la producción de leucotrieno B<sub>4</sub>, en más de un 90 % a una concentración de 50 µg/ml.

Tal como fue señalado anteriormente, los estudios previos de los extractos metanólicos de ambas especies en estudio se caracterizan por la presencia de compuestos fenólicos, los cuales poseen actividad antioxidante demostrada mediante diversos mecanismos, dentro de los mecanismos de reacción encontramos la transferencia de un átomo de hidrogeno (HAT) y la transferencia de un electrón (SET). Los métodos basados en HAT miden la capacidad de un antioxidante de atrapar radicales libres por la transferencia de un átomo de hidrogeno, estas reacciones son solvente y Ph independientes

además de rápidas usualmente se desarrollan en segundos o minutos, mientras que los métodos basados en SET miden la capacidad de un antioxidante para donar un electrón para reducir un compuesto como un metal, un grupo carbonilo o un radical y son Ph dependientes. Ambos mecanismos pueden ocurrir en paralelo (Prior et al, 2005). Otro mecanismo es mediante la inhibición de enzimas que participan en la generación de especies reactivas de oxígeno (Unnikrishnan, 2014). Un ejemplo es la inhibición de la actividad de la xantina oxidasa que es la encargada de la degradación de las purinas a ácido úrico con la consiguiente generación de anión superóxido (Cos et al, 1998).

La estructura básica de los flavonoides en cuanto a el número, posición y el tipo de sustituyentes del núcleo central juegan un importante rol en la actividad de apagamiento de especies radicales o la quelación de metales. La presencia de múltiples grupos hidroxilos son beneficiosos para la actividad antioxidante, sin embargo la quercetina es mejor antioxidante que la miricetina que tiene un OH más en su estructura (Peña, 2017). Por otro lado, también se postula que los flavonoides tienden a combinarse cuando están en mezclas, siendo posible que puedan ocurrir interacciones por puentes de hidrógeno que disminuyan la actividad antioxidante otorgada por los hidroxilos libres (Hidalgo et al., 2010)

En la actualidad la comunidad científica ha demostrado mucho interés en identificar nuevas fuentes de compuestos antioxidantes, ya que está

demostrado que el consumo de éstos previene el riesgo de enfermedades cardiovasculares, neurodegenerativas, cáncer, entre otras. Es por esto, por lo que cobra relevancia el contar con nuevas fuentes de estos metabolitos secundarios.

Con el objetivo de contribuir con el conocimiento farmacológico de dos especies autóctonas chilenas, la presente tesis busca determinar los mecanismos de acción como antioxidante(s) de los extractos metanólicos frente a distintos modelos *in vitro* (ya que la actividad antioxidante puede tener distintos mecanismos) y correlacionar dicha actividad con la estructura química de los metabolitos secundarios mayoritarios como son los compuestos fenólicos de ambas especies.

## II.- HIPÓTESIS

El extracto metanólico (EM) de *Quinchamalium chilense* obtenido desde las partes aéreas posee mejor capacidad antioxidante que el EM obtenido desde las hojas de *Adesmia boronioides*, debido a que presentan diferente composición fenólica. El primero presenta glucósidos de flavonoles como quercetina y canferol, mientras que el segundo tiene flavanonas y chalconas.

## III.- OBJETIVOS

### 3.1. Objetivo general

Determinar en forma comparativa la actividad antioxidante de dos especies autóctonas como *Q. chilense* y *A. boronioides* frente a distintos métodos.

### 3.2. Objetivos específicos.

Determinar la capacidad reductora de los EMs de ambas especies en estudio frente a los ensayos FRAP y CUPRAC.

Determinar la capacidad de apagar radicales libres de los EMs de ambas especies como anión superóxido y el radical DPPH.

Determinar la capacidad inhibitoria de los EMs sobre la actividad de la xantina oxidasa.

## CAPÍTULO IV ANTECEDENTES GENERALES

### 4.1.1. Clasificación taxonómica Quinchamalí

FAMILIA: Santalaceae

GÉNERO: *Quinchamalium*

ESPECIE: *Quinchamalium chilense*

SINÓNIMO: *Quinchamalium majus*

NOMBRE VULGAR: quinchamalí

### 4.1.2. Distribución geográfica Quinchamalí

Esta especie tiene una amplia distribución en Chile, crece desde la I Región de Tarapacá y hasta la XI Región de Aysén del General Carlos Ibáñez del Campo, es muy común en los arenales de Coquimbo, en las provincias centrales y en el sur. También se encuentra en Argentina y Bolivia (Navas, 1973).

### 4.1.3. Descripción botánica *Q. chilense*

Es una hierba perenne, de hojas carnosas y lineales de 0,5 a 4,0 cm de largo. Flores reunidas en inflorescencias en forma de cabezuelas o espigas

densas; cada flor mide entre 1- 1,5 cm de longitud, tubulosas, con 5 pétalos que se abren al exterior, de colores verdes y amarillos, naranjos o rojos por dentro. El fruto corresponde a una pequeña nuez (Navas, 1973)

#### 4.2.1. Clasificación taxonómica de *Adesmia boronioides*

FAMILIA: Papilionaceae

GÉNERO: *Adesmia*

ESPECIE: *Adesmia boronioides*

NOMBRE VULGAR: paramela

#### 4.2.2. Distribución geográfica *Adesmia boronioides*

Se encuentra en Chile en las Regiones VIII y IX. Crece en pampas y cerros entre los 150-1.480 m sobre el nivel del mar (Ulibarri y Bulkart, 2000)

También crece en la Provincia geográfica Patagónica, en Argentina: Neuquén, Río Negro, Chubut y Santa Cruz; en Chile (Ulibarri y Bulkart, 2000),

#### 4.2.3. Descripción botánica *A. boronioides*

Arbusto de 0,4-2 m de altura, a menudo de ramas rojizas, con abundantes glándulas sésiles. Hojas de 3-6 cm de longitud; folíolos de 10-20

pares, obovados, glabros y carnosos. Racimos de 5-15 cm longitud; flores de 7-10 mm de longitud (Ulibarri y Bulkart, 2000).

## CAPÍTULO 5

### CAPÍTULO MATERIALES Y MÉTODOS

#### 5.1. Reactivos

Metanol p.a, ácido clorhídrico 37% y los reactivos como ácido acético glacial, acetato de sodio, fosfato de sodio, fosfato de potasio, acetato de amonio, cloruro de cobre (I) y cloruro de cobre (II) fueron adquiridos en Merck (Damstadt, Alemania).

DPPH (1898-66-4), xantina oxidasa (9002-17-9), xantina (69-89-6), TPTZ (3682-35-7), alopurinol (315-30-0), neocuproína (484-11-7), NBT (298-83-9) y EDTA (60-00-4) fueron adquiridos en Sigma – Aldrich (Oakville, ON, USA).

Tricloruro férrico fue adquirido en Fluka (Switzerland)

El agua Milli- Q fue preparada empleando un sistema Milipore Mili-Q Plus (Milipore, Bedford, MA, USA).

#### 5.2. Material vegetal

##### 5.2.1. Recolección

Las partes aéreas de *Q. chilense*, fueron recolectadas en el mes de diciembre de 2001 en Farellones e identificadas por el Dr. José San Martín (Instituto de Biología Vegetal y Biotecnología, Universidad de Talca).

Un testigo de herbario número QF-2001.01; QF-2009.2 fue depositado en el herbario de la Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas de la Universidad de Chile.

Las hojas de *Adesmia boronioides* Hook, Fabaceae, fueron recolectadas en enero de 2010 en la laguna del Maule en la VII región del Maule, Chile siendo identificada por el Dr. José San Martín.

Un testigo de herbario fue depositado en el Instituto de Biología Vegetal y Biotecnología, Universidad de Talca

### 5.3 Obtención de los extractos

Los extractos se prepararon moliendo (3g) de material vegetal previamente secado a 50°C hasta alcanzar peso constante, el que luego fue sometido a extracciones sucesivas con solventes de polaridad creciente hasta agotamiento del material vegetal eliminando completamente el solvente por evaporación a presión reducida en un evaporador rotatorio y posterior secado a T ambiente, como se muestra en la figura 5. Para ambas especies se obtienen los extractos seriados secos de hexano, diclorometano y metanol.

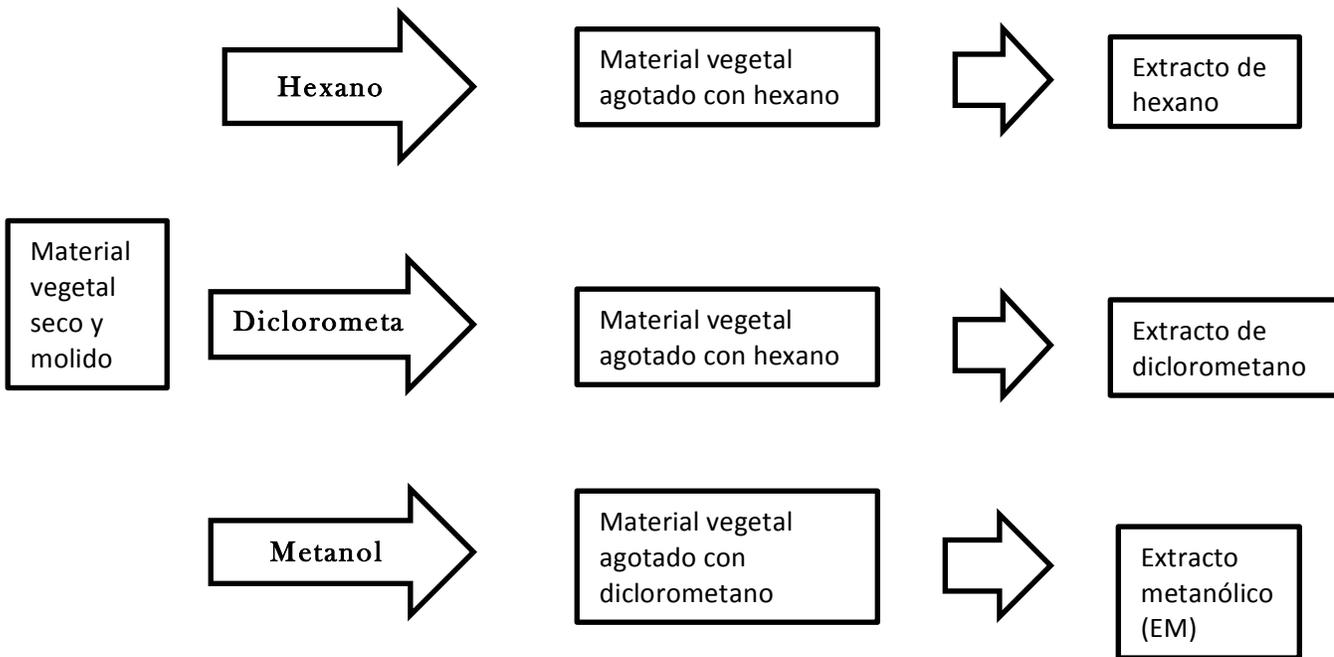


Figura 5: Proceso de preparación de los EMs de *Q. chilense* y *A. boronioides*

#### 5.4. Estudios farmacológicos *in vitro*

Los estudios *in vitro* fueron realizados en la Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas de la Universidad de Chile, en el laboratorio de Productos Naturales.

##### 5.4.1. Ensayo de poder reductor de $\text{Fe}^{+3}$ (FRAP)

El ensayo FRAP es un método simple, conveniente y reproducible que fue desarrollado inicialmente para medir la capacidad antioxidante del plasma, pero en la actualidad es ampliamente utilizado en estudios de antioxidantes en

otras muestras como comidas, extractos de plantas, juegos, entre otros (Pulido et al, 2000).

El método corresponde a una reacción redox que implica la transferencia de un electrón (mecanismo SET) desde una especie que es capaz de donar electrones al complejo  $\text{Fe}^{+3}$  - tripiridiltriazina ( $\text{Fe}^{+3}$  – TPTZ), el cual es reducido a su forma ferrosa ( $\text{Fe}^{+2}$ -TPTZ) la cual presenta un intenso color azul y un máximo de absorción a una  $\lambda$  de 593nm.

Esta reacción detecta compuestos con potenciales redox  $< 0,7$  V, por lo que es un buen indicador de la capacidad de mantener el equilibrio redox en células y tejidos

El poder reductor depende del grado de hidroxilación y la extensión de los enlaces conjugados de los compuestos presentes en las diversas muestras (Prior et al, 2005).

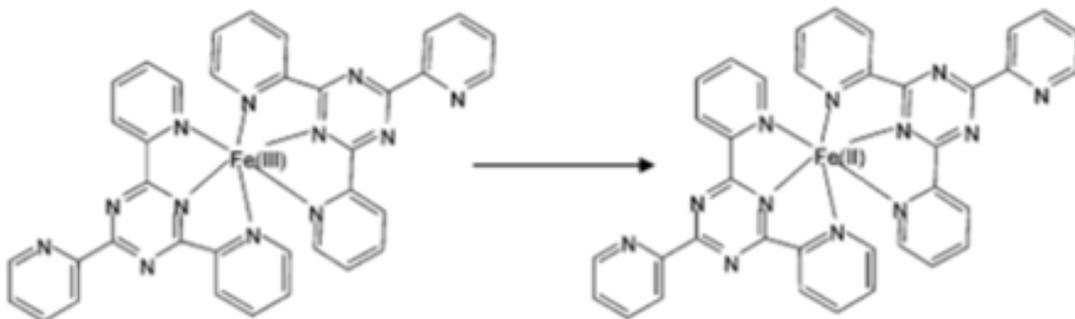


FIGURA 6: Estructura del complejo  $\text{Fe}^{+3}$  – TPTZ y su forma ferrosa (Prior et al, 2005).

Los EMs de *Q. chilense* y *A. boronioides* fueron evaluados según el siguiente protocolo

TABLA 1: Protocolo para determinar el poder reductor de Fe<sup>+3</sup>

Reactivos	Blanco	Muestra
<b>Tampón acetato</b>	1020 µL	1020 µL
<b>TPTZ</b>	100 µL	100 µL
<b>FeCl<sub>3</sub></b>	100 µL	100 µL
<b>EM</b>	---	10 µL
<b>Metanol</b>	10 µL	---
<b>Volumen total</b>	1230 µL	1230 µL

EM: extracto metanólico

Se dejó incubar a 37° C y se midió la absorbancia a  $\lambda$  593 nm a los 4, 30 y 60 min, en un espectrofotómetro UV/Vis Spectromer Unicam UV3, en ensayos independientes y por triplicado para cada uno de los tiempos. Los resultados fueron interpolados en una curva de calibración con Trolox (5-24 µM) y se expresaron como µMoles Trolox por g de extracto seco (Benzie y Strain, 1996; Henríquez et al, 2010)

El EM de *Q. chilense* se evaluó a una concentración única de 10 µg/ml mientras que de *A. boronioides* a una concentración única de 100 µg/ml (concentración que fue posible disolver en el medio de la reacción) ya que a concentraciones menores no presentó actividad.

#### 5.4.2. Apagamiento del radical DPPH en el tiempo

Este método se basa en la utilización del radical estable del nitrógeno 2,2 difenil-1-picrilhidrazilo, el cual se encuentra disponible en el mercado y presenta una absorbancia máxima a 517 nm.

El apagamiento del radical se detecta por la disminución de la absorbancia a 517 nm.

Las reacciones involucradas son las siguientes (Villaño et al, 2007)

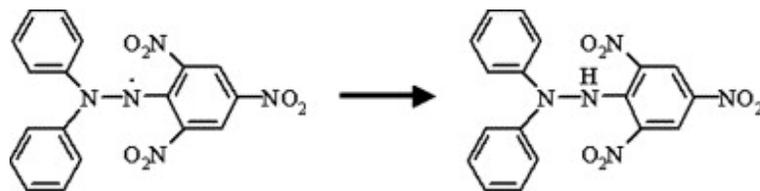
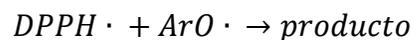
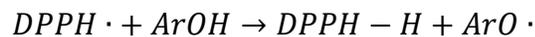


Figura 7: Estructura y esquema de reacción de apagamiento del radical DPPH (Endo et al, 2006)

Los EMs de *Q. chilense* y *A. boronioides* fueron evaluados según el siguiente protocolo.

TABLA 2. Protocolo del método de apagamiento del radical DPPH

	Control	Blanco	Muestra
<b>EM</b>	-	25 µL	25 µL
<b>DPPH</b>	975 µL	-	975 µL
<b>Metanol</b>	25 µL	975 µL	-
<b>Volumen total</b>	1000 µL	1000 µL	1000 µL

EM: extracto metanólico

Para determinar la cinética de apagamiento del radical DPPH de los distintos EMs se preparó una solución metanólica de DPPH a una concentración de 25 mg/L que presento una absorbancia de 0,700 y una coloración morada intensa la cual cambia a amarillenta a medida que el radical es apagado por el antioxidante.

La reacción se inició agregando directamente a la cubeta de cuarzo la solución de DPPH y del EM en estudio y se registraron las absorbancias ( $A_s$ ) por 100 min hasta que se alcanzó un valor constante de la A.

La curva de apagamiento se registró para cada concentración por triplicado y se hizo hasta alcanzar una A constante, lo que permitió calcular el % DPPH rem según la siguiente fórmula (Prior et al, 2005).

Fórmula:

$$\%DPPH \text{ rem} = \frac{A_{ee}}{A_0} \times 100$$

Dónde:

$A_{ee}$ : Corresponde a la absorbancia constante

$A_0$ : Corresponde a la absorbancia de la solución inicial de DPPH

Posteriormente se construyó el gráfico % DPPH rem en función de la concentración del EM ( $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) utilizando el programa Excel 2010. Se realizó una regresión lineal y se calculó la  $CE_{50}$ . Teniendo la  $CE_{50}$ , lo siguiente fue calcular  $TE_{50}$ . Por último con estos dos datos fue posible calcular la eficacia antioxidante (EA) que corresponde al parámetro que relaciona la actividad no sólo con la  $CE_{50}$  sino que también con el tiempo en que alcanza ( $TE_{50}$ ), mediante la siguiente fórmula (Prior et al, 2005)

$$EA = \frac{1}{CE_{50} \times TE_{50}}$$

Dónde:

$CE_{50}$ = Concentración efectiva en que la concentración de DPPH se reduce al 50%.

$TE_{50}$ = Tiempo necesario para que  $CE_{50}$  alcance absorbancia constante

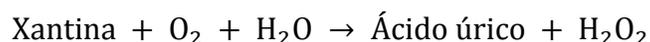
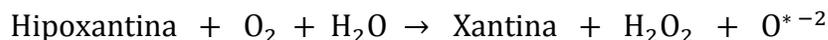
Las soluciones de los EMs de *Q. chilense* fueron estudiadas en concentraciones que van de 2,5 a 12,5  $\mu\text{g}$  de EM /ml mientras que el EM de *A. boronioides* solo fue evaluado a una concentración de 250  $\mu\text{g}/\text{ml}$  que

corresponde la máxima concentración posible de disolver en el medio de reacción.

El patrón utilizado fue Trolox cuyas soluciones se prepararon en 5 concentraciones entre 1,25 a 6,25 µg/ml

#### 5.4.3. Determinación de la inhibición de la actividad de la xantina oxidasa

La xantina oxidasa es la enzima responsable de catalizar la oxidación de hipoxantina a xantina y ácido úrico, según las reacciones que se indican a continuación (Cos *et al.*, 1998).



Para evaluar si los EMs en estudio son capaces de inhibir la actividad de la xantino-oxidasa, se midió la formación de su producto, el ácido úrico, el que presenta un máximo de absorción a una  $\lambda$  de 290 nm (Lin *et al.*, 2002) según el siguiente protocolo:

TABLA 3: Protocolo para la evaluación de la inhibición de la actividad de la xantina oxidasa por los EMs de ambas especies

TUBOS	A	B	C	D
<b>EM</b>	-	.-	1 mL	1mL
<b>Agua Milli-Q</b>	1 mL	1 mL	-	-
<b>Tampón fosfato</b>	2,9 mL	3 mL	2,9 mL	3 mL
<b>Xantina oxidasa</b>	0,1 mL	-	0,1 mL	-
Pre incubar a 25 ° C por 15 minutos				
<b>Xantina</b>	2 mL	2 mL	2 mL	2 mL
Incubar a 25 ° C por 30 minutos				
<b>HCl</b>	1 mL	1 mL	1 mL	1 mL
<b>Volumen total</b>	7 mL	7 mL	7 mL	7 mL

EM: extracto metanólico

El sistema contiene tampón fosfato (pH 7,5), enzima xantina oxidasa (Xo) 0,01 U/ml, xantina (X) 150  $\mu$ M y HCl 1 M. Las soluciones de la Xo y xantina fueron preparadas usando tampón como medio de reacción. Luego que ha transcurrido el tiempo se registró la absorbancia a una  $\lambda$  290 nm

El EM de *Q. chilense* se evaluó a una concentración máxima final de 25  $\mu$ g/mL, debido a problemas de solubilidad, mientras que el EM de *A. boronioides* fue evaluado a 50  $\mu$ g/mL

El porcentaje de inhibición de la actividad de la Xo por los EMs se calculó según la fórmula

$$\% \text{ Inhibición} = \frac{(A - B) - (C - D)}{A - B} * 100$$

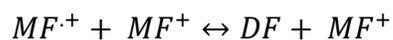
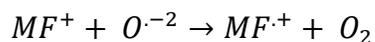
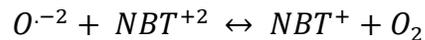
Donde:

A-B: corresponde al ácido úrico total

C-D: corresponde al ácido úrico remanente

#### 5.4.4. Determinación de la neutralización del anión superóxido

Como ya se dijo en el apartado anterior la reacción catalizada por la Xo no solo genera como producto ácido úrico sino que también anión superóxido, el que es capaz de reducir al azul de nitrotetrazolio para dar paso a la formación de monoformazán el que origina el diformazán, según las siguientes reacciones



(MF<sup>+</sup>: monoformazán)

El EM que presenten actividad disminuirá el anión superóxido presente en el medio de reacción, con lo cual disminuirán el NBT<sup>2+</sup> que se reduce y por lo

tanto se formará una menor cantidad de diformazán disminuyendo la A respecto del control negativo.

Las estructuras del NBT y de diformazán se presentan en las figuras siguientes:

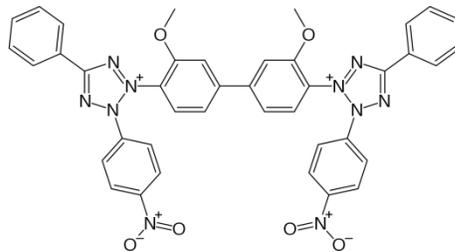


FIGURA 8: Estructura del azul 2,2 di nitro- tetrazolio ( $\text{NBT}^{+2}$ ) (Udilova, 1999)

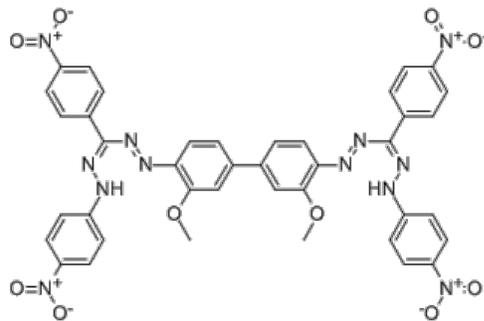


FIGURA 9: Estructura del diformazán (DF) (Udilova, 1999)

El ensayo fue llevado a cabo según el protocolo mostrado en la Tabla 4

TABLA 4: Protocolo para medición de la capacidad de apagamiento del radical superóxido

TUBOS	A	B	C	D
<b>Tampón fosfato</b>	2,4 MI	2,5 mL	2,4 MI	2,5 mL
<b>Xantina</b>	0,1 mL	0,1 mL	0,1 mL	0,1 mL
<b>EDTA</b>	0,1 mL	0,1 mL	0,1 mL	0,1 mL
<b>NBT</b>	0,1 mL	0,1 mL	0,1 mL	0,1 mL
<b>Agua milli-Q</b>	0,1 mL	0,1 mL	-	-
<b>EM</b>	-	-	0,1 mL	0,1 mL
Pre incubar a 25 °C por 10 minutos				
<b>Xo</b>	0,1 mL	-	0,1 mL	-
Incubar a 25 °C por 20 minutos				
<b>CuCl</b>	0,1 mL	0,1 mL	0,1 mL	0,1 mL
<b>Volumen total</b>	3 mL	3 mL	3 MI	3 mL

EM: extracto metanólico; Xo: xantino oxidasa

El sistema contiene la solución de xantina y EDTA a una concentración inicial de 3 mM, NBT a 0,75 mM y tampón fosfato a pH 7,5. La reacción es detenida con una solución 6 mM de CuCl.

Las concentraciones ensayadas para los EMs fueron las mismas que en el ensayo para determinar inhibición de la xantina oxidasa.

El porcentaje de producción de anión superóxido se calculó según la fórmula

$$\% \text{ apagamiento del radical} = \frac{(A - B)(C - D)}{A - B} * 100$$

Dónde:

A - B: Valor del diformazán total

C- D: Valor del diformazán remanente.

#### 5.4.5. Ensayo para determinar el poder reductor de $\text{Cu}^{+2}$ (CUPRAC)

El método corresponde a una reacción redox que implica la transferencia de un electrón (mecanismo SET) desde una especie que es capaz de donar electrones al complejo  $\text{Cu}^{+2}$  –neocuproína ( $\text{Cu}^{+2}$ – Nc), el cual es reducido a su forma ( $\text{Cu}^{+1}$ -Nc) la cual presenta un intenso color amarillo y un máximo de absorción a una  $\lambda$  de 450 nm.

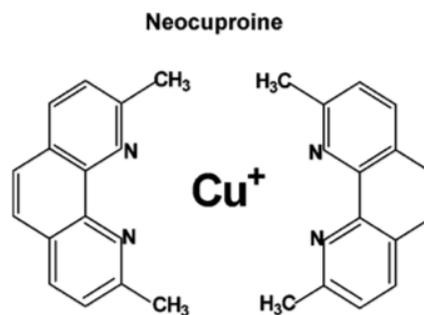


FIGURA 10: Estructura del complejo  $\text{Cu}^{+1}$  – neocuproína (Apak et al, 2004)

Los EMs de *Q. chilense* y *A. boronioides* fueron evaluados según el siguiente protocolo.

TABLA 5: Protocolo para determinar el poder reductor de  $\text{Cu}^{+2}$  de los EMs de las especies en estudio

Reactivos	Blanco	Muestra
<b>Tampón acetato</b>	1 ml	1 ml
<b>Neocuproina</b>	1 ml	1 ml
<b><math>\text{CuCl}_2</math></b>	1 ml	1ml
<b>Agua destilada</b>	1 ml	1ml
<b>EM</b>	---	0,1 ml
<b>Metanol</b>	0,1 ml	---
<b>Volumen total</b>	4,1 mL	4,1 mL

EM: extracto metanólico

Se incubó a temperatura ambiente y se midió la absorbancia a 450 nm a los 60 min (Apak et al, 2004), en un espectrofotómetro UV/Vis Spectromer Unicam UV3, en ensayos independientes y por triplicado. Los resultados fueron interpolados en una curva de calibración con Trolox (20-39  $\mu\text{M}$ ) y se expresaron como  $\mu\text{M}$  Trolox/g extracto seco.

El EM de *Q. chilense* se evaluó a 24,4  $\mu\text{g/ml}$  mientras que el de *A. boronioides* a 244  $\mu\text{g/ml}$ , dado que ha concentraciones menores no presentaba actividad.

#### 5.4.6. Análisis estadístico

Para todos los métodos utilizados en esta tesis, la significancia de los resultados se calculó con el método Anova de una vía para datos independientes considerándose estadísticamente significativos para un  $p \leq 0,05$  y mediante test de Tukey de comparaciones múltiples

## CAPÍTULO VI

### RESULTADOS y DISCUSION

#### 6.1 Determinación de la capacidad reductora por el método FRAP

A continuación, se presentan los resultados obtenidos en el ensayo FRAP, en primer lugar, se muestra la curva de calibración utilizando Trolox. Los resultados fueron expresados como  $\mu\text{M}$  equivalentes Trolox/ g de extracto seco. Se utilizó trolox como compuesto de referencia.

##### 6.1.1. Poder reductor de $\text{Fe}^{+3}$

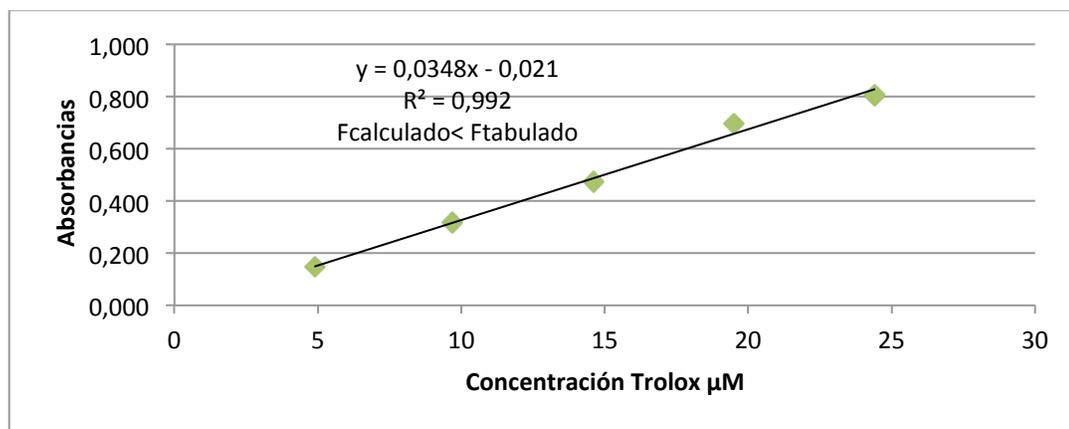


Figura 11: Curva de calibración con Trolox (5-24  $\mu\text{M}$ )

Tabla 6: Valores FRAP de los EMs de *Q. chilense* y *A. boronioides*

Muestra	mM Equivalentes Trolox/g extracto seco		
	4 min	30 min	60 min
<b>EMQ1</b>	1,157 ± 0,043* <sup>1</sup>	1,746 ± 0,029* <sup>1</sup>	2,253 ± 0,032* <sup>1</sup>
<b>EMQ2</b>	1,117 ± 0,067* <sup>1</sup>	1,894 ± 0,046* <sup>1</sup>	2,310 ± 0,060* <sup>1</sup>
<b>EMAB1</b>	0,089 ± 0,005	0,152 ± 0,002	0,298 ± 0,006
<b>EMAB2</b>	0,089 ± 0,003	0,182 ± 0,009	0,223 ± 0,001
<b>Quercetina</b>	10,191 ± 0,033	13,396 ± 0,551	22,225 ± 0,245

\*: Diferencia estadísticamente significativa con quercetina ( $p \leq 0,05$ ; <sup>1</sup>: diferencia estadísticamente significativa con EMAB1 y EMAB2; EMQ1: extracto metanólico de *Q. chilense*; EMQ2: réplica del EMQ1; EMAB1: extracto metanólico de *A. boronioides*; EMAB2: réplica del EMAB1

La absorbancia en presencia de los EMs de ambas especies continuó aumentando hasta los 60 min, luego de ese tiempo no se registraron diferencias significativas en los valores FRAP obtenidos, lo mismo sucede con quercetina (compuesto de referencia). El que los EMs tengan un menor poder reductor que quercetina puede ser explicado porque al tratarse de extractos se tienen compuestos que se pueden potenciar pero también algunos de ellos presentan antagonismo con lo que se tiene un menor poder reductor.

Como se observa en la tabla los valores FRAP de los EMs de ambas especies presentan diferencias significativas, a los 4, 30 y 60 min, respecto del compuesto de referencia. Sin embargo, los obtenidos para *Q. chilense* son superiores a los observados en *A. boronioides*, lo que se podría explicar por el perfil de compuestos fenólicos presentes en cada uno de ellos.

Compuestos fenólicos que presentan el grupo catecol en el anillo A, el grupo hidroxilo en la posición 3, el doble enlace en C2-C3 y una función ceto en C4 en el anillo C, son los que obtienen valores FRAP más elevados lo que permite inferir que estos grupos funcionales son lo que tienen una mayor contribución al poder reductor (Firuzi et al, 2005).

Considerando los antecedentes arriba señalados, los bajos valores FRAP obtenidos por los EMs se pueden explicar por la escasa o nula presencia de compuestos que cumplan con estas condiciones estructurales. Muñoz y colaboradores aislaron 5 glucósidos de quercetina y canferol además de rutina y pinocembrósido, todos estos compuestos son O-hetersidos en el C3 del anillo C, con lo cual se pierde uno de los requisitos principales para la actividad reductora. Por otro lado el extracto EM de *Adesmia boronioides* (EMAB) está constituido por flavanonas y chalconas, que presentan bajo poder reductor dado que no cumplen los requisitos estructurales como el doble enlace entre C2-C3 y el grupo hidroxilo en C3 del anillo C

#### 6.1.2. Apagamiento del radical DPPH

En las siguientes tablas y figuras se presentan los resultados obtenidos al evaluar la actividad sobre el apagamiento de radicales libres, mediante el método colorimétrico del DPPH, del EM de ambas especies en estudio y de Trolox utilizado como compuesto de referencia.

La cinética fue determinada hasta alcanzar absorbancias constantes con el fin de calcular los porcentajes de DPPH remanente para todas las concentraciones. Esta relación resultó lineal y de estas curvas se calculó la  $CE_{50}$ .

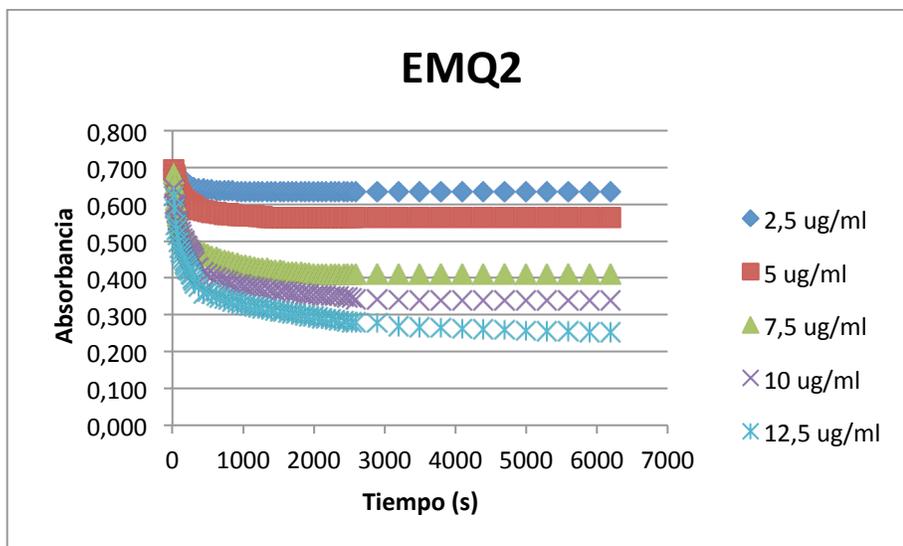
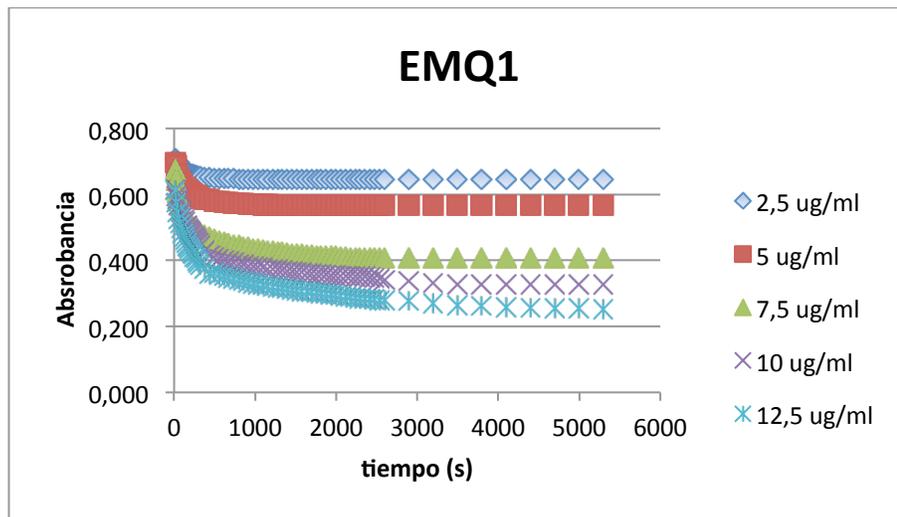
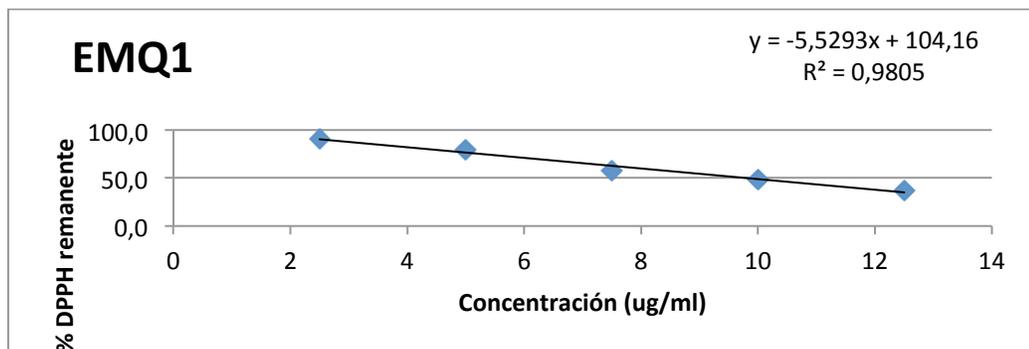
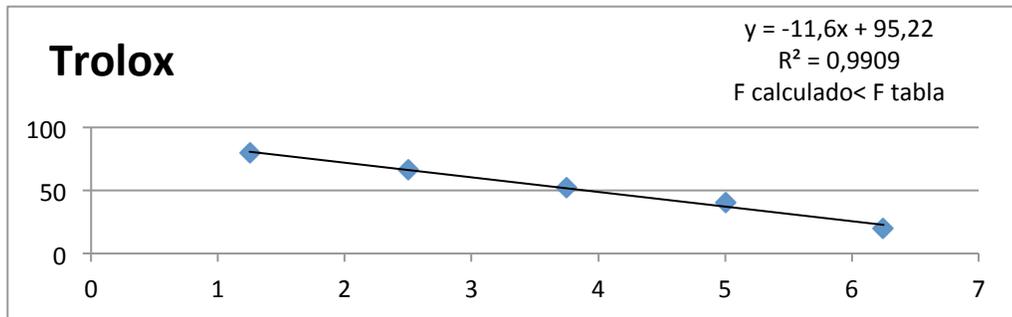


Figura 12: Curva apagamiento del radical DPPH de los EMs de *Q. chilense*

Desde el gráfico anterior se obtiene la absorbancia en el estado estacionario con lo que se construye el grafico % DPPH remanente en función de la concentración.

La relación entre la concentración y el porcentaje de DPPH remanente, resultó lineal tanto para Trolox como para el EMQ1 y EMQ2. El coeficiente de correlación para Trolox fue de 0,9909 y el F calculado fue menor al F tabla. Mientras que para el EMQ1 fue de 0,9805 y para EMQ2 fue de 0,9831 y un F calculado menor al F tabulado.



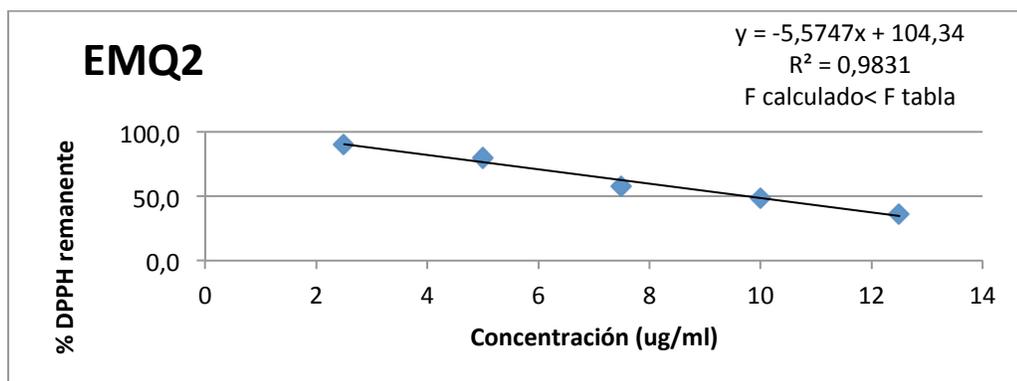


Figura 13: Gráfico % DPPH remanente de Trolox y de los EMs de *Q. chilense*.

De este gráfico y mediante regresión lineal utilizando Excel 2010 se obtuvo la  $CE_{50}$  para los EMs en estudio. A continuación se calculó  $TE_{50}$  y la EA.

Tabla 7:  $CE_5$ ,  $TE_{50}$  y EA frente al radical DPPH de los EMs de *Q. chilense* y *A. boronioides* y Trolox

Muestra	Ecuación	$R^2$	$CE_{50}$ ( $\mu\text{g/ml}$ )	$TE_{50}$ (min)	EA ( $\text{mL}/\mu\text{g}^*\text{min}$ ) * 10
<b>EMQ1</b>	-5,5x + 104, 16	0,9805	9,8 ± 0,1	75,0 ± 0,6	1,4 ± 0,1*
<b>EMQ2</b>	-5,5x + 104, 34	0,9831	9,7 ± 0,2	67,6 ± 2,9	1,5 ± 0,1*
<b>EMAB1</b>	n.d	n.d	>>250	n.d	n.d
<b>EMAB2</b>	n.d	n.d	>>250	n.d	n.d
<b>Trolox</b>	-11,6x + 95,22	0,9909	3,9 ± 0,0	7,1 ± 0,1	35,411 ± 0,006

1: Todas las curvas cumplen con la prueba de carencia de ajuste (F calculado < F tabla = 3,708264); \*: Diferencia estadísticamente significativa respecto de Trolox  $p \leq 0.05$ ; EMQ1: extracto metanólico de *Q. chilense*; EMQ2: réplica del extracto de *Q. chilense*; EMAB1: extracto metanólico de *A. boronioides*, EMAB2: réplica del extracto de *A. boronioides*, n.d: parámetro no determinado.

Los resultados obtenidos pueden ser explicados por la estructura que presentan los compuestos presentes en los EMs de ambas especies. En el caso de *Q. chilense* el EM está constituido principalmente por flavonoles

glicosilados. Los valores en *A. boronioides* no fueron determinados dado que se evaluó la máxima concentración permitida por la solubilidad de los extractos sin obtener apagamiento del radical DPPH. Los flavanoles presentes en el EMQ presentan mayor capacidad de apagamiento del radical DPPH que otros polifenoles como las flavanonas presentes en el EMAB, ya que los derivados de quercetina presentes en el EMQ se caracterizan porque el anillo B es un catecol y éste es un buen neutralizador del radical DPPH (Okawa, 2001)

#### 6.1.3. Determinación de la inhibición de la enzima xantina oxidasa y atrapamiento de anión superóxido

Se realizaron por separado los ensayos para medir la actividad inhibitoria de los EMs sobre la actividad de la enzima Xo y su capacidad de apaga el anión superóxido descartando de esta manera que la disminución del radical se debiera sólo al efecto inhibitorio sobre de la actividad de la enzima.

A continuación se presentan los resultados obtenidos al evaluar el compuesto de referencia (alopurinol) en el ensayo de inhibición de la actividad de la Xo para validar el método utilizado en esta memoria de título.

TABLA 8: Porcentaje de inhibición de la actividad de la xantina oxidasa y porcentaje relativo de ácido úrico en presencia de alopurinol a diferentes concentraciones.

Cf Alopurinol (µg/ml)	A/B ± D.S	C/D ± D.S	% Ac. Úrico	%I
<b>15</b>	0,484± 0,006	0,071± 0,002	14,7	85,3
<b>5</b>	0,484± 0,006	0,103 ± 0,002	21,3	78,7
<b>4</b>	0,468 ± 0,005	0,138 ± 0,002	29,5	70,5
<b>2</b>	0,468 ± 0,005	0,331± 0,002	70,7	29,3
<b>1</b>	0,484 ± 0,006	0,458 ± 0,009	94,6	5,4
<b>0,15</b>	0,523 ± 0,028	0,509 ± 0,027	97,3	2,7

Cf:Concentración final ensayada de alopurinol; C/D: Absorbancia promedio de la muestra; A/B absorbancia promedio del control negativo; D.S: desviación estándar, %I: porcentaje de inhibición enzimática.

Tabla 9: Porcentaje de inhibición de xantina oxidasa y cantidades relativas de ácido úrico en presencia de los EMs de *Q. chilense* y *A. boronioides*

Muestra	Cf (µg/ml)	A/B ± D.S	C/D ± D.S	% Ac. Úrico	%I
<b>EMQ1</b>	25	0,495 ± 0,003	0,475 ± 0,005	96,0	4,0*
<b>EMQ2</b>	25	0,495 ± 0,003	0,489 ± 0,002	97,1	2,9*
<b>EMB1</b>	50	0,543 ± 0,002	0,469 ± 0,007	86,2	13,8*
<b>EMAB2</b>	50	0,543 ± 0,002	0,476 ± 0,002	87,6	12,4*
<b>Alopurinol</b>	15	0,484± 0,006	0,071± 0,002	14,7	85,3

\*: Diferencia estadísticamente significativa respecto del alopurinol  $p \leq 0.05$ ; EMQ1: extracto metanólico de *Q. chilense*, EMQ2: réplica del EMQ1, EMAB1: extracto metanólico de *A. boronioides*; EMAB2: réplica del EMAB1, cf: concentración final en el medio de reacción, C/D: Absorbancia promedio con las muestras, A/B: absorbancia promedio con el control negativo; D.S: desviación estándar

Ninguno de los EMs mostró un porcentaje de inhibición significativo sobre la actividad de la enzima.

Existen características estructurales que son necesarias para que los compuestos presenten actividad inhibitoria sobre la actividad de la Xo. El doble enlace entre C2 y C3 que mantiene la estructura plana de los flavonoides es esencial para potenciar la actividad inhibitoria sobre Xo. Los flavonoides no planares no presentan actividad inhibitoria de la actividad de la enzima, los hidroxilos libres en C5 y C7 y el grupo carbonilo en C4 contribuyen favorablemente con la formación de puentes de hidrógeno e interacciones electrostáticas entre los inhibidores y el sitio activo de la enzima. Sin embargo, los compuestos sustituidos en el OH del C3 del anillo benzopirano presentan débil actividad lo que puede ser explicado por la desestabilización de los hidroxilos polares en la región hidrofóbica del sitio activo lo que genera una baja afinidad (Cos et al, 1998).

Los resultados pueden ser explicados por la estructura de los compuestos fenólicos presentes que en el caso de *Q. chilense* son glucósidos de flavonoles, mientras que por el lado de *A. boronioides* tenemos flavanonas y chalconas que tienen baja actividad.

A continuación, en la Tabla 10 se presentan los resultados del ensayo para evaluar la capacidad de neutralizar el anión superóxido de los EMs de ambas especies en estudio y de la quercetina usada como compuesto de referencia.

Tabla 10: Porcentaje de apagamiento del anión superóxido y cantidades relativas de este compuesto en presencia de los EMs de *Q. chilense* y *A. boronioides*

Muestra	Cf. (ug/ml)	A/B ± D.S	C/D ± D.S	% Superóxido	% Disminución Superóxido
<b>EMQ1</b>	25	0,258 ± 0,002	0,173 ± 0,006	67	33*
<b>EMQ2</b>	25	0,258 ± 0,002	0,156 ± 0,004	62	38*
<b>EMAB1</b>	50	0,258 ± 0,002	0,211 ± 0,008	81,8	18,2*
<b>EMAB2</b>	50	0,258 ± 0,002	0,211 ± 0,005	81,8	18,2*
<b>Quercetina</b>	6,7	0,380 ± 0,004	0,039 ± 0,001	10,3	89,7

\*: Diferencia estadísticamente significativa con quercetina ( $p \leq 0,05$ ; 1: diferencia estadísticamente significativa con EMAB1 y EMAB2; EMQ1: extracto metanólico de *Q. chilense*; EMQ2: réplica del EMQ1; EMAB1: extracto metanólico de *A. boronioides*; EMAB2: réplica del EMAB1, C/D: Absorbancia promedio de las muestras, A/B: absorbancia promedio del grupo control, D.S: Desviación estándar, cf: concentración final

El EM que exhibió los mayores porcentajes de neutralización fue el EMQ, lo que indica que posee metabolitos secundarios son capaces de apagar el anión superóxido y que esta baja no es por la inhibición de la Xo..

Los requisitos estructurales para que un compuesto sea eficiente en la disminución del anión superóxido son la presencia de un OH en C3 del anillo B y en C3 del anillo C (Cos et al, 1998).

#### 6.1.4. Poder reductor de $\text{Cu}^{+2}$

A continuación se presentan los resultados obtenidos en esta investigación. En la Figura 14 se muestra los resultados de construcción de la

curva de calibración utilizando Trolox. Los resultados son expresados como  $\mu\text{M}$  equivalentes Trolox/ g de extracto seco. En este ensayo se empleó el flavonol quercetina como compuesto de referencia.

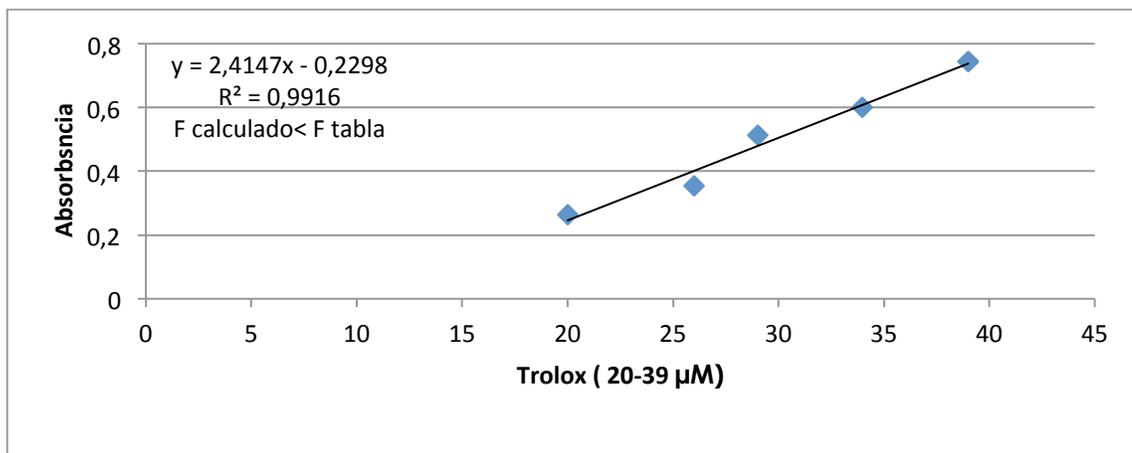


Figura 14: Curva calibración Trolox (20-39  $\mu\text{M}$ ).

Tabla 11: Valores CUPRAC de los EMs de *Q. chilense* y *A. boronioides*.

Muestra	umoles Equivalentes Trolox /g extracto
<b>EMQ1</b>	20,32 $\pm$ 0,73 <sup>*1</sup>
<b>EMQ2</b>	18,39 $\pm$ 0,08 <sup>*1</sup>
<b>EMAB1</b>	1,21 $\pm$ 0,01 <sup>1</sup>
<b>EMAB2</b>	0,92 $\pm$ 0,01 <sup>1</sup>
<b>Quercetina</b>	45,08 $\pm$ 0,01

\*: Diferencia estadísticamente significativa con quercetina ( $p \leq 0,05$ ; <sup>1</sup>: diferencia estadísticamente significativa con EMAB1 y EMAB2; EMQ1: extracto metanólico de *Q. chilense*; EMQ2: réplica del EMQ1; EMAB1: extracto metanólico de *A. boronioides*; EMAB2: réplica del EMAB1

Al igual que en el ensayo FRAP, las diferencias en la capacidad de reducir el complejo de  $\text{Cu}^{+2}$  entre los EMs de *Q. chilense* y *A. boronioides* fueron significativas, teniendo un mayor poder reductor del  $\text{Cu}^{+2}$  el EMQ, esto dado

por la estructura de los compuestos fenólicos con mayor cantidad de grupos hidroxilos presentes además de tener mayor grado de conjugación en comparación con las flavanonas y chalconas presentes en el EMAB.

En la tabla siguiente se presenta un resumen de los resultados obtenidos por los extractos de ambas especies que permite tener una visión general acerca de los distintos métodos antioxidantes probados en esta tesis.

Tabla 12: Resumen resultados de los diferentes ensayos para los dos extractos evaluados

Método/Muestra	EMQ1	EMQ2	EMAB1	EMAB2
FRAP mM Equivalentes Trolox/g extracto seco	2,25	2,31	0,29	0,22
DPPH (CE <sub>50</sub> ug/ml )	9,8	9,7	>>>250	>>>250
CUPRAC (uM Equivalentes Trolox /g extracto seco	20,32	18,39	1,21	0,92
Inhibición Xo (%Inhibición)	4,0	2,9	13,8	12,4
Apagamiento anión superóxido (%reducción)	33	38	18,2	18,2

## CAPÍTULO VII

### CONCLUSIONES

Se demostró la hipótesis planteada ya que el EM de *Q.chilense* mostro una mayor actividad antioxidante que el EM de *A. boroniodes*.

El haber realizado el proceso de extracción por duplicado nos permitió demostrar que las diferencias encontradas en la actividad antioxidante no no se debieron al proceso de extracción ya que no hubo diferencias estadísticamente significativas en ninguno de los ensayos entre los EMs y su réplica.

Dado que un extracto puede contener metabolitos secundario con actividades antioxidantes con distintos mecanismos, avala el uso de distintas metodología en este estudio.

Los resultados obtenidos en esta memoria están directamente relacionados con la composición química descrita para ambos EMs, teniendo en cuenta que *Q. chilense* exhibió mejores resultados antioxidantes que *A. boronioides*. La presencia de heterósidos de flavonoles en el EM de *Q. chilensis*, podría explicar en parte su mayor poder antioxidantes respecto del EM de *A. boronioides* el cual presenta flavanonas y chalconas, éstos tiene una capacidad antioxidante menor que la de los Flavonoles. El EM de *Q. Chilense* presentó poder reductor en el ensayo FRAP, apagó el radical DPPH y el anión superóxido.

El EM de *A. borniodes* solo mostró un efecto estadísticamente significativo en el ensayo para evaluar la capacidad de apagar el anión superóxido.

## CAPÍTULO VII

### REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

Agnese A., Pérez C., Cabrera, J. *Adesmia aegiceras*: Antimicrobial activity and chemical study. *Phytomedicine* 2001; 8(5); 389–394

Apak, R.; Guclu, K.; Ozyurek, M.; Karademir, S. Novel Total Antioxidant Capacity Index for Dietary Polyphenols and Vitamins C and E, Using Their Cupric Ion Reducing Capability in the Presence of Neocuproine: CUPRAC Methodological Journal Agricultural Food Chemistry 2004; 52; 7970-7981

Aquini R., Mencherini T., Picern P., Christen P., Castro C., Villarroel P., Delporte C., Muñoz O. Antioxidant Activity of Selected Chemical Constituents of *Quinchamalium chilensis*. *International Journal of Pharmaceutical Sciences and Nanotechnology*. 2014; 8; 2775-2778

Benzie I. F.F, Strain J.J. The Ferric Reducing Ability of Plasma (FRAP) As a Measure of "Antioxidant Power": The FRAP Assay. *Analytical Biochemistry*. 1996; 239; 70-76.  
Capacity and Phenolics in Foods and Dietary Supplements. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 2005; 53; 4290-4302

Cos P., Ying L., Calomme M., Hu J., Cimanga K., Van Poel B., Pieters L., Vlietnick A., Vanden Berguen D. Structure- Activity Relationship and Classification of Flavonoids as Inhibitor of Xanthine Oxidase and Superoxide Scavengers. *Journal Natural Product* 1998; 61; 71-76

Firuzi O., Lacanna A., Petrucci R., Marrosu G., Saso L. Evaluation of the antioxidant activity of flavonoids by ferric reducing antioxidant power assay and cyclic voltammetry. *Biochimica et Biophysica Acta* 2005; 1721; 174-184

Gastaldi B., González S., Aseff Y. Antioxidant activity of extracts and essential oil from *Adesmia boronioides* Hook.f. medicinal native plant from Patagonia. XXXIV Jornadas Argentinas de Botanica. 2013.

González S., Bandoni A., Van Baren C., Di Leo Lira P., Cerda-García- Rojas C., Joseph-Nathan P. The essential oil of the aerial parts of *Adesmia boronioides* Hook. f. *Journal of Essential Oil Research* 2004; 16; 513-516

Gu J., Wang Y., Franzblau G., Montenegro G., Timmermann B. Constituents of *Quinchamalium majus* with Potential Antitubercular Activity. *Zeitschrift für Naturforschung* 2004; 59c; 797-802

Henríquez C., Almonacid S., Chiffelle I., Valenzuela T., Araya M., Cabezas L.; Simpson R., Speisky H. Determination Of Antioxidant Capacity, Total Phenolic Content And Mineral Composition of Different Fruit Tissue Of Five Apple Cultivars Grown In Chile. *Chilean Journal of Agricultural Research*. 2010; 70; 523-536.

Hidalgo M., Sánchez-Moreno C., Pascual-Teresa S., Flavonoid–flavonoid interaction and its effect on their antioxidant activity. *Food Chemistry* 121:691–696, 2010

Lin Ch., Chen Ch., Chen Ch., Liang Y., Lin J. Molecular modeling of flavonoids that inhibits xanthine oxidase. *Biochemical and biophysical research communications* 2002; 294; 167-172

Muñoz O, Montes M, Wilkomirsky T. *Plantas Medicinales de Uso en Chile. Química y farmacología*.2004; Ed. Universitaria. Santiago. Chile.

Navas, E. *Flora de la cuenca de Santiago de Chile*. Universidad de Chile 1973

Okawa M., Kinjo J., Nohara T., Ono M. DPPH (1,1-difenil-2-picrilhidrazilo) Radical Scavenging Activity of Flavonoids Obtained From Some Medicinal Plants. *Biology Pharmaceutcal Bull* 2001; 10, 1202-1205

Peña. M, Estudio comparativo de la composición química y actividad antioxidante de hojas de distintos genotipos de *Ugni molinae*. Estudio del mecanismo antiinflamatorio de uno de los extractos bioactivos. (Tesis Doctorado). Universidad de Chile 2017.

Pulido R., Bravo L., Saura-Calixto F. Antioxidant Activity of Dietary Polyphenols As Determined by a Modified Ferric Reducing/Antioxidant Power Assay. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 2000; 48; 3396- 3402

Simirgiotis M., Silva M., Becerra J., Schmeda-Hirschmann G. Direct characterisation of phenolic antioxidants in infusions from four Mapuche medicinal plants by liquid chromatography

with diode array detection (HPLC-DAD) and electrospray ionisation tandem mass spectrometry (HPLC-ESI-MS. Food Chemistry 2012; 131; 318–327

UDILOVA N., Vergleichende Untersuchung von Methoden zum Nachweis von Superoxidradikalen in biologischen und Modellsystemen. Dissertation zur Erlangung des akademischen Grades doctor rerum naturalium (Dr.rer.nat.) im Fach Physik. Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät I der Humboldt-Universität zu Berlin. März 1999

Ulibarri E., Burkart A. Sinopsis de las especies de *Adesmia* (Leguminosae, Adesmieae) de la Argentina. Darwiniana 2000; 30 (1-2); 59-126

Unnikrishnan M., Veerapur† V., Nayak Y., Paul P., Mathew G. Antidiabetic, Antihyperlipidemic and Antioxidant Effects of the Flavonoids.2014; 1; 143-161

Villaño D., Fernández-Pachón M., Moyá M., Troncoso A., García-Parrilla M. Radical scavenging ability of polyphenolic compounds towards DPHH free radical. Talanta 2007; 71; 230-235.

## ANEXO

Presentación oral en 2° Congreso Latinoamericano de Plantas Medicinales  
Universidad de Santiago de Chile

**Evaluación de la capacidad antioxidante del extracto metanólico de las partes aéreas de *Quinchamalium chilense*.**

Evaluation of the antioxidant capacity of methanolic extract of the aerial parts of *Quinchamalium chilense*

Pamela Villarroel<sup>1</sup>, Jorge Arancibia-Radich<sup>1</sup>, Paola Guzmán<sup>1</sup>, Orlando Muñoz<sup>2</sup>, Carla Delporte<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Facultad Ciencias Químicas y Farmacéuticas, Universidad de Chile, Santiago, Chile

<sup>2</sup> Facultad de Ciencias, Universidad de Chile, Santiago, Chile

El objetivo de este trabajo fue evaluar la capacidad antioxidante de las partes aéreas de *Quinchamalium chilense* contribuyendo al conocimiento farmacológico de esta especie autóctona. Para esto se prepararon extractos seriados con solventes de polaridad creciente tales como: hexano diclorometano y metanol, utilizando sólo el extracto metanólico (EM) para este estudio, por su riqueza relativa en compuestos fenólicos. Para evaluar la actividad antioxidante in vitro se utilizó el método FRAP (poder reductor de Fe +3), el cual al pasar a su forma ferrosa presenta una coloración azul. Para determinar los valores FRAP, se construyó una curva de calibración utilizando FeSO<sub>4</sub> la que permitió expresar los valores FRAP de cada EM como mmoles Fe<sup>+2</sup>/g de EM seco. Además se utilizó el ensayo de apagamiento del radical DPPH, el cual en su forma reducida presenta una disminución de la absorbancia. Los resultados fueron expresados como a) concentración efectiva cincuenta (CE50 concentración del EM que produce el apagamiento del 50% del DPPH inicial) y b) tiempo efectivo cincuenta (TE50 tiempo en que el EM a la concentración efectiva cincuenta alcanza la absorbancia constante). Los resultados obtenidos en el ensayo FRAP muestran que el EM alcanza un valor FRAP de 4,0 a los 60 min, mientras que para el apagamiento del radical DPPH se obtiene una CE50 de 9,8 µg/ml y un TE50 de 71 min. Como sustancia de referencia fue utilizado Trolox en ambos ensayos. El análisis estadístico se realizó mediante el test ANOVA de una vía en ambos ensayos. Los resultados obtenidos muestran

que el EM presenta actividad antioxidante mediante dos mecanismos de acción diferentes, poder reductor de Fe<sup>+3</sup> y apagamiento del radical DPPH, esta actividad puede ser atribuida en parte a los compuestos fenólicos que han sido reportados en esta especie como glucósidos de canferol, glucósidos de quercetina y rutina

Publicación de los resultados año 2015 en el International Journal of Pharmaceutical Sciences and Nanotechnology en colaboración con el Profesor Orlando Muñoz.

International Journal of Pharmaceutical Sciences and Nanotechnology

Volume 8 • Issue 1 • January – March 2015

MS ID: IJPSN-10-24-14-AQUINO

Research Paper

## Antioxidant Activity of Selected Chemical Constituents of *Quinchamalium chilensis*

Rita Aquino<sup>1</sup>, Teresa Mencherini<sup>1</sup>, Patrizia Picerni<sup>1</sup>, Philippe Christen<sup>2</sup>, Consuelo Castro<sup>3</sup>, Pamela-Villaruel, Carla Delporte and Orlando Muñoz<sup>4\*</sup>

<sup>1</sup>University degli studi di Salerno, Department of Pharmacy, Salerno, Italy, <sup>2</sup>School of Pharmaceutical Sciences, University of Geneva, University of Lausanne, Geneva, Switzerland; <sup>3</sup>Universidad de Chile, Facultad de Ciencias Químicas y farmacéuticas, Departamento de Química, Farmacológica y Toxicológica, Santiago, Chile; <sup>4</sup>Universidad de Chile, Facultad de Ciencias, Departamento Química, Santiago, Chile.

Received October 24, 2014; accepted December 23, 2014

### ABSTRACT

Antioxidant compounds from plant sources have been used worldwide for a variety of indications. In this study, phytochemical investigation of the aerial parts of *Quinchamalium chilensis* Mol. (Santalaceae) resulted in the isolation and identification of four flavonol glycosides, quercetin-3-O-β-D-glucopyranosyl-(1 2)-[α-L-rhamnopyranosyl-(1 6)]-β-D-glucopyranoside(1), kaempferol-3-O-β-D-glucopyranosyl-(1 2)-[α-L-rhamnopyranosyl-(1 6)]-β-D-glucopyranoside(2), quercetin-3-O-xylosyl-(1 2)-[α-L-rhamnopyranosyl-(1 6)]-β-D-glucopyranoside(3) and rutin(4), as well as one flavanone glycoside, pinocembrin(5). The compounds were identified by 1D- and 2D-NMR

comparison with those reported in literature. These compounds were isolated for the first time from the leaves of *Q. chilensis*. The antioxidant properties of the extract were investigated using DPPH and ferric reducing antioxidant potential (FRAP) assays. Total phenolic content was determined by the Folin-Ciocalteu method. Significant relationship between antioxidant capacity and total phenolic content was found, indicating that phenolic compounds are the major contributors to the antioxidant properties of this plant. These active molecules have therapeutic potential in treating conditions associated with oxygen free radicals.