



UNIVERSIDAD DE CHILE

FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS Y FARMACÉUTICAS

DEPARTAMENTO DE QUÍMICA FARMACOLÓGICA Y TOXICOLÓGICA

LABORATORIO DE FARMACOLOGÍA Y TOXICOLOGÍA

**Efecto redox de diferentes extractos herbales sobre biomoléculas:
lípidos de membrana y tioles proteicos**

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

VALENTINA INÉS VENEGAS ROMERO

Santiago de Chile

2012

Nuestra gloria más grande no consiste en no haberse caído nunca, sino en haberse levantado después de cada caída.

AGRADECIMIENTOS

Primero, agradecer a Dios por acompañarme en este camino y por darme fuerza todos los días para continuar en pie ante cualquier dificultad.

Estar en este momento al final de mi carrera profesional no hubiese sido posible sin la ayuda de mis padres, que confiaron en mí desde el primer momento y que hicieron su mayor esfuerzo para que esto fuera posible dándome siempre su apoyo incondicional. A mis hermanos Marión, Leonardo y Jorgito (mi regalón) por darme alegría y hacerme olvidar los problemas en cada visita que hice a mi casa durante esta etapa.

A Jaime, mi marido, porque apareciste en la mitad de este proceso y has sido fundamental, todos los días has estado ahí apoyándome y dándome ánimo para seguir adelante. Gracias por amarme y por ser mi compañero en este proceso.

Agradecer a mis amigos de la Universidad, en especial a mis amigas Roberta y Natalia, por las juntas de estudio en los primeros años, por prestarme los apuntes y por estar siempre presentes cuando lo necesité.

A las personas que conocí en el laboratorio, que fue mi segundo hogar este último tiempo, Daniel, Carmen Luz, Felipe, Andrea, Don José, por todo su apoyo y por hacer más alegres los momentos de espera de los experimentos.

Al equipo de trabajo del laboratorio de la Sra. Ximena Polanco por su colaboración y disposición en el desarrollo de este trabajo.

A mi querida Profesora María Eugenia Letelier por estar siempre presente ante cualquier dificultad, por sus consejos, por su paciencia eterna y por sus ganas constantes de enseñarme día a día.

ABREVIATURAS

1-Cl-2,4-DNB : 1-cloro-2,4-dinitrobenceno

DTNB : Ácido 5,5'-ditio-*bis* (2-nitrobenzoico)

DTT : Ditiotreitól

GST : Glutación transferasa

ÍNDICE GENERAL

	<i>Página</i>
DEDICATORIA.....	II
AGRADECIMIENTOS.....	III
ABREVIATURAS.....	IV
ÍNDICE GENERAL.....	V
ÍNDICE DE FIGURAS.....	VII
INDICE DE TABLAS.....	VIII
RESUMEN.....	IX
SUMMARY.....	X
I. INTRODUCCIÓN.....	1
Hipótesis.....	6
Objetivos generales.....	6
Objetivos específicos.....	7
II. MATERIALES Y MÉTODOS.....	8
Reactivos.....	8
Animales de experimentación.....	9
Preparación de microsomas hepáticos de rata.....	9
Cuantificación de polifenoles.....	10
Condiciones oxidativas.....	10

Lipoperoxidación microsómica.....	11
Determinación de tioles microsomales.....	12
Quelación de Cu ²⁺	13
Actividad GSH-transferásica microsómica.....	13
Análisis estadístico.....	14
III. RESULTADOS.....	15
Polifenoles totales de los extractos herbales.....	15
Prevención de la lipoperoxidación microsómica.....	16
Prevención de la oxidación de tioles microsómicos.....	21
Reversión de la oxidación de tioles microsómicos.....	22
Capacidad quelante de Cu ²⁺ de los diferentes extractos.....	25
Actividad GSH-transferásica microsómica en presencia de los extractos herbales.....	27
IV. DISCUSIÓN.....	31
CONCLUSIÓN.....	37
V. REFERENCIAS.....	36

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura N°		Página
1	Lipoperoxidación microsómica inducida por el sistema Cu^{2+} /ascorbato en presencia de los extractos herbales	17
2	Gráficos semilogarítmicos de la lipoperoxidación microsómica inducida por el sistema Cu^{2+} /ascorbato en presencia de los extractos herbales	18
3	EC_{50} de la lipoperoxidación microsómica <i>versus</i> la concentración de polifenoles de los extractos	20
4	Prevención de la Oxidación de tioles microsómicos inducida por el sistema Cu^{2+} /ascorbato	23
5	Reversión de la Oxidación de tioles microsómicos inducida por el sistema Cu^{2+} /ascorbato	24
6	Modificación del espectro de absorbancia de Cu^{2+} en presencia de los extractos herbales	26
7	Pendientes de formación del conjugado GSH-DNB en ausencia y presencia de los extractos herbales	27
8	Inhibición de la actividad GSH-transferásica <i>versus</i> reversión de la oxidación de tioles microsómicos	30

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla N°		Página
1	Polifenoles totales	15
2	Efecto comparativo de los extractos herbales sobre la lipoperoxidación microsómica inducida por el sistema Cu^{2+} /ascorbato	19
3	Pendientes de las rectas de la Figura 5	28
4	Velocidad de formación del conjugado GSH-DNB en presencia de los diferentes extractos	29

**Efecto redox de diferentes extractos herbales sobre biomoléculas:
Lípidos y tioles proteicos de membrana microsómica**

Las plantas poseen diferentes tipos de antioxidantes, entre ellos compuestos polifenólicos y azufrados; entre estos últimos, GSH y cisteína, principales antioxidantes no enzimáticos de la célula animal. La capacidad antioxidante de los preparados herbales depende de numerosas variables, entre ellas, la parte de la planta seleccionada y el proceso de extracción. En este trabajo se analizó la actividad antioxidante de diferentes extractos herbales de los cuales se recibió sólo los nombres que mencionamos a continuación: Gel Aloe Vera, Phytopol Calafate, Phytopol Equisetum, Phytopol Murtilla, Phytopol Abedul, Phytopol Caléndula, Phytopol Romero, Phytopol Matico y Phytopol Avellano. Como sistema biológico, se utilizaron microsomas hepáticos de rata y como sistema pro-oxidante, Cu^{2+} /ascorbato. Se ensayó la capacidad de los extractos de prevenir la lipoperoxidación microsómica y la disminución de los tioles microsómicos, ambos fenómenos inducidos por el sistema Cu^{2+} /ascorbato. Se evaluó además, la capacidad de quelar iones Cu^{2+} mediante el cambio del espectro de absorbancia de este ion y la capacidad de inhibir la actividad de la GSH-transferásica microsómica, enzima cuya forma activa es el dímero -S-S-. Los resultados mostraron gran diversidad en los efectos antioxidantes ensayados y falta de correlación entre las actividades antioxidantes y la concentración de polifenoles totales de los extractos. Por ejemplo, Phytopol matico que contenía la mayor concentración de polifenoles, no fue el mejor antilipoperoxidante, pero si en las otras actividades medidas. Estos resultados indicarían diversidad en la calidad y cantidad de los antioxidantes presentes en cada uno de los extractos. Esta diversidad nos parece que apoya el uso de extractos polivalentes como estrategia terapéutica asociada a enfermedades que reconocidamente, están asociadas a estrés oxidativo.

Redox effect of different herbal extracts on biomolecules: Lipids and thiol groups in microsomal membrane

Plants have different types of antioxidants, between them polyphenol and sulfur compounds; between latter, GSH and cysteine, the main non enzymatic antioxidants of animal cell. Numerous variables are involved in the antioxidant capacity of herbal preparations, including the part of plant selected and the extraction process. In this work, the antioxidant capacity of different herbal extracts was studied. Only the names of these extract were received at the beginning of this study and they are the following: Gel Aloe Vera, Phytopol Calafate, Phytopol Equisetum, Phytopol Murtilla, Phytopol Abedul, Phytopol Caléndula, Phytopol Romero, Phytopol Matico y Phytopol Avellano. As biological system rat liver microsomes were used and as prooxidant system, Cu^{2+} /ascorbate. The assays were: prevention of microsomal lipid peroxidation and decreasing of microsomal thiol content, both phenomena induced by Cu^{2+} /ascorbate. Also, the capacity to chelate Cu^{2+} through the change of its absorbance spectrum was assayed. On the other hand, inhibition of microsomal GSH-transferase activity was measured; the dimeric form -S-S is the active form of this enzyme. The antioxidant capacity of the herbal extracts showed great diversity in all of the antioxidant assays tested. Moreover, the antioxidant capacity of them did not show a correlation with their polyphenol concentration e.g. Phytopol matico containing the highest polyphenol concentration did not present the highest anti- lipid peroxidation activity, but it had the highest activity in all other antioxidant assays. These result seem indicate a great diversity in the quality and quantity of antioxidant compounds present in the extracts. This diversity supports the use of polyvalent phytodrugs as therapeutic strategy for diseases associated to oxidative stress.

I. INTRODUCCIÓN

Actividad redox de compuestos herbales antioxidantes.

Los seres vivos en general están expuestos a cambios en el medio ambiente y en su organismo, lo que puede desencadenar la producción de especies reactivas de oxígeno. Los organismos poseen mecanismos antioxidantes enzimáticos y no enzimáticos que tienen como objetivo prevenir y disminuir el daño oxidativo [1,2]. En plantas podemos encontrar mecanismos antioxidantes que incluyen metabolitos de tipo polifenólicos que las protegen de la radiación solar UV [3,4]. Ellos poseen además, compuestos azufrados antioxidantes, como por ejemplo el GSH y la cisteína que es un aminoácido tiólico componente del tripéptido GSH (γ -glutamil-cisteinil-glicina), principal y mayoritario antioxidante no enzimático de la célula animal.

Los mecanismos antioxidantes de los polifenoles y tioles incluyen su capacidad de atrapar radicales libres del oxígeno y de quelar metales de transición en su estado iónico libre a través de las reacciones de Haber Weiss y/o Fenton [3-8].



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 así la de los compuestos polifenólicos [6-8]. En todo tipo de células esta reversibilidad es el resultado de mecanismos enzimáticos concertados que involucran el uso de GSH como agente reductor [9-10].

Más aún, 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 [11]. Así, los compuestos polifenólicos y tiólicos pueden actuar como agentes nucleofílicos, además de participar en reacciones redox [6-11]. Como tales, ellos forman aductos covalentes con metabolitos electrofílicos anulando así su alta reactividad y toxicidad. Estos metabolitos electrofílicos pueden ser generados como productos de la biotransformación de xenobióticos, entre ellos los fármacos y son también componentes de los contaminantes ambientales [12]. Cabe señalar que cuando los compuestos polifenólicos y tiólicos reaccionan como nucleófilos formando aductos, estos son consumidos irreversiblemente, lo que provoca una disminución de la capacidad antioxidante celular [13]. En este sentido, los compuestos tiólicos parecen ser agentes nucleofílicos más eficientes que los polifenoles [7,13]. De estos antecedentes se concluye que el estrés oxidativo puede ocurrir como consecuencia de un cambio redox de los circuitos tiólicos y del consumo irreversible debido a la formación de aductos covalentes de los tioles [11]. Así, el estrés oxidativo inducido a través de los circuitos tiólicos parece ser más importante que el generado por las especies reactivas del oxígeno (EROs) [19]. Por ejemplo, la interrupción de la función y la homeostasis de los sistemas tiólicos, es la característica central del estrés oxidativo observado en el envejecimiento, como también en las enfermedades relacionadas con el envejecimiento [19]. Más aún, existen tioles redox-sensibles presentes en diferentes proteínas y/o péptidos que son críticos en transducción de señales (ej. H-Ras, PTP-1B), factores de transcripción que se unen a DNA (ej. Nrf2, NFκβ), activación de receptores (ej. integrina αIIβ3 en la activación de plaquetas, etc.) [19].

El estado redox de los sistemas tiólicos que son sensibles a oxidantes no-radicalarios, son controlados por las tiorredoxinas (Trx), GSH y cisteína [19-20]. Los sistemas regulados por las tiorredoxinas y el GSH se mantienen en condiciones estables pero no en equilibrio, debido a una continua oxidación de los tioles celulares; ellos se oxidan a una velocidad aproximada de 0,5% de los tioles totales/min [20-21]. Oxidantes no-radicalarios, incluyendo peróxidos, aldehídos, quinonas y epóxidos son generados enzimáticamente de precursores endógenos y exógenos; ellos no requieren intermediarios radicalarios para oxidar compuestos tiólicos celulares [19]. Si estos oxidantes se generan en forma aberrante, ellos podrían afectar los circuitos tiólicos, alterando las funciones biológicas de ellos. Más aún, los tioles de bajo peso molecular, GSH y cisteína, pueden actuar como agentes quelantes de iones metálicos, lo cual también podría ocurrir con los grupos tiólicos redox sensibles de proteínas, alterando su función [20-21].

Bastante se ha investigado en relación a los mecanismos antioxidantes de polifenoles de origen herbal [8], no así en relación a la acción antioxidante de compuestos azufrados de plantas. Las plantas superiores, como otros organismos aeróbicos, requieren oxígeno para la eficiente producción de energía [1]. Para ello, han desarrollado la vía foto respiratoria que regenera el NADP⁺, a través de la cadena de transporte de electrones que reduce el O₂ a H₂O, condiciones necesarias para la fijación de CO₂. Al igual que en organismos animales, la vía foto respiratoria también genera radicales libres del oxígeno y H₂O₂. Este último también puede formarse durante el catabolismo de los lípidos como un subproducto de la β-oxidación de ácidos grasos. Un ambiente estresante para las plantas, como la sequía, el estrés salino, el ozono y las temperaturas altas o bajas, reducen las defensas incluyendo la capacidad antioxidante. Por lo tanto, es razonable esperar que plantas que crecen en ambientes de alto estrés tengan mayor capacidad antioxidante que aquellas que crecen en praderas con posibilidades hídricas mayores y menor radiación

UV. ¿Cuáles son los principios activos antioxidantes más relevantes en este tipo de plantas que crecen en ambientes estresados? Los antecedentes que permitirían contestar esta pregunta son escasos y al parecer los principios activos más relevantes en estas plantas serían compuestos azufrados, los cuales permitirían mantener regulados los circuitos tiólicos celulares.

Datos no publicados aún de nuestro Laboratorio han demostrado que extractos secos de distintas plantas muestran concentraciones distintas de polifenoles y tioles. No tenemos aun antecedentes suficientes que nos permitan hacer una correlación entre la cantidad de tioles presentes en extractos preparados a través de un mismo proceso y su capacidad reductora. Entre los compuestos tiólicos de las plantas podemos mencionar aminoácidos esenciales para el hombre como metionina, y semi-esenciales como cisteína y taurina que son sintetizados a partir de metionina.

En general, el estado redox del residuo tiólico de las proteínas animales que contienen cisteína, está involucrado en la expresión de su función biológica. Así por ejemplo la GSH-transferasa microsómica y la UDP-glucuroniltransferasa se activan en presencia de H_2O_2 , activación oxidativa que es revertida por agentes reductores de tioles como DTT [22-23].

GSH-transferasa. La actividad GSH-transferásica está representada por una familia de isoenzimas ampliamente distribuidas en el organismo. Estas enzimas catalizan la conjugación de sustancias electrofílicas con GSH [24]. Así, las GSH-transferasas son enzimas críticas ya que están encargadas de la eliminación de compuestos electrofílicos, altamente tóxicos para los organismos vivos. La conjugación de compuestos electrofílicos desde la célula es la primera etapa en la vía de su excreción como ácidos mercaptúricos [25]. El conjugado con GSH sufre un proceso metabólico por el que secuencialmente son eliminados el γ -glutámico y la glicina desde el GSH y finalmente el grupo amino

de la cisteína es acetilado, dando origen a los derivados del ácido mercaptúrico que son los metabolitos que finalmente aparecen en la orina.

Esta familia de enzimas se localiza en el citosol (isoformas citosólicas) o en el retículo endoplásmico (isoformas microsómicas) y en la mitocondria [24]. Se ha demostrado que la forma activa de esta enzima es un dímero -S-S- [26-28]; los monómeros reducidos de la GST citosólica o microsómica son inactivos [8,29]. La isoforma de la GST citosólica contiene 3-4 residuos de cisteína y solamente un dímero específico representa la forma activa de esta enzima [26]. Por otra parte la isoforma de GST microsómica que es la más abundante contiene solamente un residuo de cisteína y por lo tanto, solo es posible la formación de un dímero -S-S- activo catalíticamente [26].

Los antecedentes mostrados nos llevaron a evaluar en este trabajo la actividad antioxidante de diferentes extractos herbales, los cuales fueron recepcionados desde la empresa, con un único antecedente que fue el nombre de la planta de la cual provienen. Al final de este trabajo, la empresa nos acompañó una ficha que indica varias características de cada uno de los extractos ensayados. Estas fichas se acompañan al final de este manuscrito como anexos.

Para analizar la actividad antioxidante de estos preparados se utilizó como sistema biológico, microsomas hepáticos de rata y como sistema pro-oxidante, Cu^{2+} /ascorbato. Se ensayó la capacidad de los extractos de prevenir la lipoperoxidación microsómica y la disminución de los tioles microsómicos, ambos fenómenos inducidos por el sistema Cu^{2+} /ascorbato. Se evaluó además, la capacidad de los extractos de quelar iones Cu^{2+} mediante el cambio del espectro de absorbancia de este ion. Por otra parte, se determinó la capacidad de los extractos de inhibir la actividad de la GSH-transferásica microsómica, enzima cuya forma activa corresponde al dímero -S-S-. Los resultados obtenidos como su discusión se dan a continuación.

HIPÓTESIS

Existen numerosas variables que inciden en la capacidad antioxidante de preparados herbales. Las de mayor importancia involucran la droga vegetal y el proceso de extracción utilizados. Así, se postula que:

“Extractos herbales de distinta procedencia difieren ampliamente en su capacidad antioxidante”.

OBJETIVO GENERAL

Comparar la actividad antioxidante de diferentes extractos herbales cuya única característica conocida es la planta que le dio origen.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Caracterizar los extractos de acuerdo a su contenido de polifenoles.
2. Determinar la capacidad de los extractos 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. Evaluar la capacidad de los extractos de quelar Cu^{2+} .
5. Determinar la capacidad de los extractos de inhibir la actividad catalítica de la GST microsómica de hígado de rata.

II. MATERIALES Y MÉTODOS

Reactivos. El ácido 5,5'-ditio-*bis*-(2-nitrobenzoico) (DTNB), el 1-cloro-2,4-dinitrobenzoceno (DNB), la albumina sérica de bovino (Fracción IV) fueron obtenidos en Sigma Chemical Co. (EE.UU). El ácido tricloroacético (TCA), el ácido tiobarbitúrico (TBA), el CuSO₄ y el reactivo de Folin-Ciocalteu fueron adquiridos en Merck (Chile). Catequina [(+) -cianidol - 3 - (2*R*,3*S*) - 2-(3,4-dihidroxifenil)-3,4-dihidro-1(2*H*) -benzopiran -3 ,5,7 - triol], ascorbato de sodio, GSH se obtuvieron de Sigma-Aldrich. El resto de los reactivos utilizados fueron del mejor grado analítico.

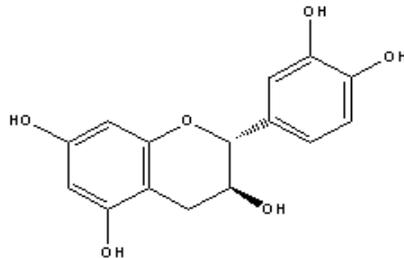
Los extractos fueron donados por Laboratorios Ximena Polanco (Santiago, Chile). La información acerca del tipo de droga vegetal como también del proceso de preparación de estos extractos, es propiedad de la empresa. En Anexos se entrega la información acerca de las características de cada extracto, la cual fue enviada por la empresa al término de este trabajo.

- | | |
|--|-------------------|
| 1. Gel Aloe Vera (<i>Aloe barbadense</i> M.) | Serie N° 09 249 1 |
| 2. Phytopol Calafate (<i>Berberis buxifolia</i> Lam.) | Serie N° 04 739 1 |
| 3. Phytopol Equisetum (<i>Equisetum bogotense</i>) | Serie N° 09 797 1 |
| 4. Phytopol Murtilla (<i>Ugni molinae</i>) | Serie N° 08 789 1 |
| 5. Phytopol Abedul (<i>Betula pendula</i>) | Serie N° 09 804 1 |
| 6. Phytopol Caléndula (<i>Calendula officinalis</i>) | Serie N° 09 799 1 |
| 7. Phytopol Romero (<i>Rosmarinus officinalis</i>) | Serie N° 09 795 1 |
| 8. Phytopol Matico (<i>Buddleja globosa</i> H.) | Serie N° 09 801 1 |
| 9. Phytopol Avellano (<i>Corylus máxima</i> L.) | Serie N° 11 689 0 |

Animales de experimentación. Se utilizaron ratas macho adultas de la cepa Sprague Dawley, de tres meses de edad y de un de peso corporal aproximado de 250g. Estos animales se obtuvieron del Bioterio de la Facultad de 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 fue preparada de acuerdo a Letelier y cols., 2010 [27]. Las ratas fueron sometidas a ayuno por 15 horas con agua *ad libitum*, y sacrificadas por decapitación. Los hígados fueron perfundidos *in situ* con 0,9% P/V NaCl, removidos por incisión, y puestos en hielo. Todos los procedimientos de homogenización y fraccionamiento fueron realizados a 4°C, y todas las centrifugaciones fueron realizadas usando ya sea una centrifuga con refrigeración Hermle modelo Z326K o una ultracentrifuga Beckman modelo XL-90. El tejido hepático (9-11 g de peso húmedo), carente del tejido conectivo y vascular, fue homogenizado con 4 volúmenes de 0,154 M de KCl, con ocho pasajes en un homogeneizador Dounce Wheaton B utilizando un motor Heidolph modelo RZR1 a 250rpm. El homogeneizado fue centrifugado a 9.000g por 15min y el sedimento se descartó. El sobrenadante obtenido fue centrifugado a 105.000g por 60min. El *pellet* (microsomas) fue almacenado a -80°C en un freezeril-Shin modelo DF8514 por hasta 3 meses. La cuantificación de la proteína microsómica se determinó por el método de Lowry y cols., 1951 [28], utilizando albúmina sérica de bovino (fracción IV) como estándar.

Cuantificación de Polifenoles: La determinación de polifenoles totales se realizó de acuerdo al método descrito en Letelier y cols., 2009 [29]. Este método utiliza catequina como estándar.

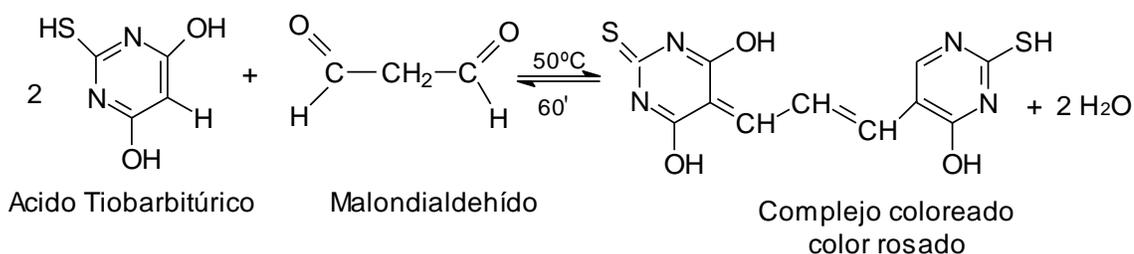


Catequina

En un volumen final de 2 mL la mezcla de reacción contenía: diferentes concentraciones de los extractos herbales diluidos en agua. A estos volúmenes se les adicionó 100 μL de reactivo Folin Ciocalteau, 300 μL de carbonato de sodio 20% p/V y agua destilada suficiente para completar 2 mL. El blanco contenía todos los reactivos con excepción de los extractos herbales. Todas las mezclas así obtenidas fueron incubadas a oscuridad durante 2 horas. Al finalizar este periodo, la absorbancia de las muestras fue registrada a 760 nm en un espectrofotómetro UV3 Unicam UV-VIS, usando los blancos respectivos como referencia. La linealidad del 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 25 μM y ascorbato 1mM, ambas concentraciones finales en la mezcla de reacción.

Liperoxidación microsómica: La liperoxidación 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., 2005 [30]. El malondialdehído, generado como producto de la descomposición de los lipoperóxidos formados, reacciona con el ácido tiobarbitúrico dando lugar a un conjugado, el cual posee una absorbancia máxima a 532 nm ($\epsilon_{532} = 156.000 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$).



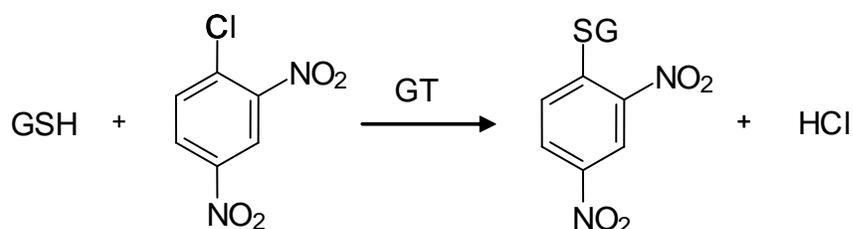
Las mezclas de reacción contenían en concentraciones finales: microsomas (0,5 mg de proteína) suspendidos en amortiguador fosfato 50 mM, pH 7,4 las cuales fueron preincubados con los extractos durante 10 min a 37°C antes de agregar el sistema oxidante Cu^{2+} /ascorbato. Los blancos contenían todos los reactivos con la única excepción de la proteína microsómica. Muestras y blancos fueron incubados durante 30 min a 37°C; al cabo de este período, se les adicionó 0,5 mL de TCA 20% p/V frío (4°C) y luego, fueron centrifugados a 9000 x g durante 10 min a 4°C en una centrífuga Hermle, modelo Z326K. Alícuotas de 0,5 mL de los sobrenadantes de las muestras y los blancos fueron mezcladas con 0,5 mL de TBA 35 mM, y luego incubadas durante 60 min a 50°C para el desarrollo de color. Al término de este periodo, se registró la absorbancia de las muestras a 532 nm en un espectrofotómetro UV3 Unicam UV-VIS, usando los blancos como referencia.

Determinación de tioles microsomales. La medición de los tioles totales se realizó de acuerdo a la técnica descrita por Letelier y cols., 2005 [30]. Esta técnica cuantifica espectrofotométricamente el TNB liberado en la reacción entre el DTNB y los grupos sulfhidrilos presentes en la muestra. Este compuesto absorbe a 412 nm y su coeficiente de extinción es $13.600 \text{ M}^{-1} \times \text{cm}^{-1}$. La mezcla de reacción contenía en un volumen de 1,0 mL, los reactivos siguientes (concentraciones finales): amortiguador fosfato de potasio 50 mM, pH 7,4; proteína microsómica 1,0 mg; concentraciones de los distintos extractos naturales, equivalentes a sus EC_{80} determinados en los experimentos de lipoperoxidación microsómica; CuSO_4 25 μM ; ascorbato 1 mM; DTNB 0,3mM. Los blancos contenían todos los reactivos, a excepción de la proteína microsómica. Las mezclas se incubaron durante 10 min, a 37°C, en un baño termostático y con agitación constante. A continuación se adicionó el DTNB a todas las mezclas y se incubaron nuevamente durante 60 min a 37°C en un baño termostático con agitación constante. Al cabo de este período las muestras se centrifugaron a 9.000 x g durante 10 min en una centrifuga refrigerada (4°C) Heraeus Biofuge 15R, con el objeto de decantar la suspensión microsómica. A continuación, se leyeron las absorbancias de los sobrenadantes a 412 nm en un espectrofotómetro Unicam UV VIS modelo UV3 acoplado a un computador, utilizando para ello sus blancos respectivos. El contenido de tioles fue expresado en μmoles de tioles/ mg de proteína microsómica.

Quelación de Cu²⁺. Una solución de CuSO₄ 0,5 mM en ausencia y presencia de los extractos herbales en estudio fue sometida a un barrido entre 200 y 600 nm, en un espectrofotómetro UV-VIS modelo UV3 acoplado a un computador. El espectro del CuSO₄ 0,5 mM se realizó utilizando como referencia, amortiguador fosfato 50 mM, pH 7,4. La referencia en el caso de las mezclas CuSO₄/extracto fue una alícuota del extracto en ensayo (10 µL o 20 µL) diluida en amortiguador fosfato 50 mM, pH 7,4.

Actividad GSH-transferásica microsómica. Esta actividad se determinó por el método descrito en Letelier y cols., 2009 [22]. La conversión del sustrato 1-cloro-2,4-dinitrobenzénico (DNB) en conjugado de GSH, produce un cambio en las propiedades espectrales de este sustrato que se aprovecha para cuantificar la reacción. El conjugado formado posee una absorbancia máxima 340 nm y su coeficiente de extinción es 9,6 mM⁻¹ cm⁻¹. La velocidad de reacción se determinó midiendo en forma continua el aumento de absorbancia a 340 nm en un espectrofotómetro UNICAM VIS Modelo 3, termorregulado y acoplado a un computador.

La ecuación química que representa la reacción enzimática es la siguiente:



La mezcla de reacción contenía (concentraciones finales) en un volumen de 1 mL: amortiguador fosfato de potasio 0,1 M pH 6,5; proteína microsómica 0,1 mg /mL; GSH 4 mM; DNB 1 mM. Se utilizó como blanco un sistema que contenía todos los componentes de la mezcla de reacción, omitiendo el GSH. La reacción se inició agregando el GSH a las muestras. La velocidad de reacción se determinó, midiendo en forma continua a 20°C, el aumento de absorbancia a 340 nm en un espectrofotómetro UNICAM VIS modelo 3, termorregulado y acoplado a un computador.

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

III.RESULTADOS

Polifenoles totales de los extractos herbales. La Tabla 1 muestra el contenido de polifenoles de los diferentes extractos en estudio. Dado que se utilizó como estándar de polifenoles, catequina, los resultados están expresados en mg equivalentes de catequina/mL de extracto y en η moles equivalentes de catequina/ μ L de extracto. El contenido total de polifenoles menor le correspondió al Gel Aloe Vera ($0,2 \pm 0,01$ η moles equivalentes de catequina/ μ L extracto). Le siguen en orden de menor a mayor de contenido de polifenoles totales los extractos Phytopol Caléndula ($4,8 \pm 0,18$), Phytopol Avellano ($8,7 \pm 0,48$), Phytopol Calafate ($11,6 \pm 0,44$), Phytopol Abedul ($13,3 \pm 0,50$), Phytopol Romero ($17,4 \pm 0,66$), Phytopol Murtilla ($23,8 \pm 0,91$), Phytopol Equisetum ($24,3 \pm 0,93$) y Phytopol matico ($28,0 \pm 1,07$).

Tabla 1. Polifenoles totales

Extractos	mg equivalentes de catequina/mL	ηmoles equivalentes de catequina/μL
Gel Aloe Vera	$0,05 \pm 0,005$	$0,2 \pm 0,01$
Phytopol Caléndula	$1,4 \pm 0,09$	$4,8 \pm 0,18$
Phytopol Avellano	$2,5 \pm 0,20$	$8,7 \pm 0,48$
Phytopol Calafate	$3,4 \pm 0,24$	$11,6 \pm 0,44$
Phytopol Abedul	$3,9 \pm 0,29$	$13,3 \pm 0,50$
Phytopol Romero	$5,1 \pm 0,27$	$17,4 \pm 0,66$
Phytopol Murtilla	$6,9 \pm 0,54$	$23,8 \pm 0,91$
Phytopol Equisetum	$7,1 \pm 0,53$	$24,3 \pm 0,93$
Phytopol Matico	$8,2 \pm 0,36$	$28,0 \pm 1,07$

Los valores representan el promedio de al menos 3 experimentos independientes \pm DE. Catequina fue utilizada como estándar.

Prevención de la lipoperoxidación microsómica inducida por el sistema Cu^{2+} /ascorbato en presencia de los extractos herbales. En la Figura 1 aparecen las curvas directas de las concentraciones de los extractos *versus* el % de lipoperoxidación residual. A partir de estos datos, se construyeron las curvas semilogarítmicas que se muestran en la Figura 2. De estas curvas se obtuvieron los EC_{50} que aparecen en la Tabla 2. Los EC_{50} representan la cantidad de extracto que fue capaz de prevenir en un 50% la lipoperoxidación microsómica inducida por el sistema Cu^{2+} /ascorbato. Cabe destacar que los lípidos provienen de una muestra de microsomas hepáticos de rata (0,5 mg de proteína microsómica). El extracto Phytopol Romero mostró el menor EC_{50} (0,44 μmoles equivalentes de catequina/0,5 mg proteína microsómica), por lo tanto, el que mostró mayor actividad antilipoperoxidante. Le siguen en orden de menor a mayor de EC_{50} los extractos Phytopol Murtilla (0,45), Phytopol Avellano (0,63), Phytopol Abedul (1,3), Phytopol Equisetum (1,4), Phytopol Calafate (2,2), Phytopol Matico (2,2), Gel Aloe Vera (11,2) y Phytopol Caléndula (14,8). Cabe destacar que estos dos últimos presentan una diferencia muy grande tanto en el contenido de polifenoles como en sus EC_{50} , en comparación con el resto de los extractos ensayados.

Uno de los mecanismos a través de los cuales los antioxidantes polifenólicos ejercen su efecto antioxidante es a través de su capacidad de secuestrar radicales libres. En este trabajo se utilizó como sistema pro-oxidante Cu^{2+} /ascorbato el cual genera el radical anión superóxido a través de la reacción de Haber Weiss. Así, postulamos una posible correlación entre la capacidad anti-lipoperoxidante medida como EC_{50} y la concentración de polifenoles de los extractos. Al intentar ensayar gráficamente esta correlación, no se observó esta correlación lineal. La Figura 3 muestra una comparación entre el contenido de polifenoles y los EC_{50} de la lipoperoxidación que demuestra la falla en la correlación entre contenido de polifenoles y la capacidad antilipoperoxidante de los extractos.

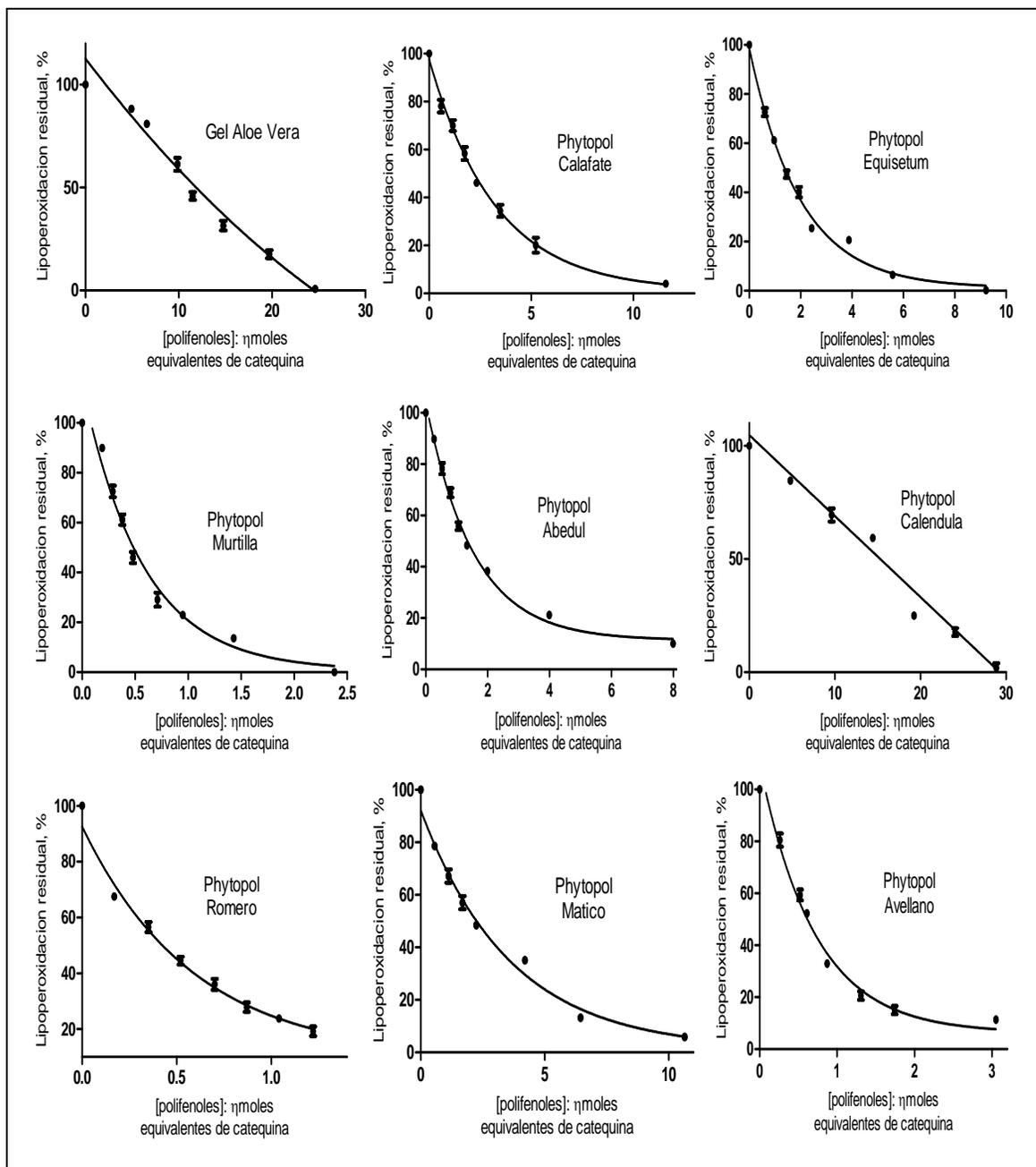


Figura 1. Lipoperoxidación microsómica inducida por el sistema Cu^{2+} /ascorbato en presencia de los extractos herbales. Los gráficos muestran las concentraciones ensayadas de los extractos *versus* el porcentaje de lipoperoxidación residual; esta fue calculada considerando como 100% aquella obtenida en ausencia de extracto. El ensayo de lipoperoxidación se realizó de acuerdo a lo descrito en Métodos. Los valores representan el promedio de al menos 3 experimentos independientes \pm DE.

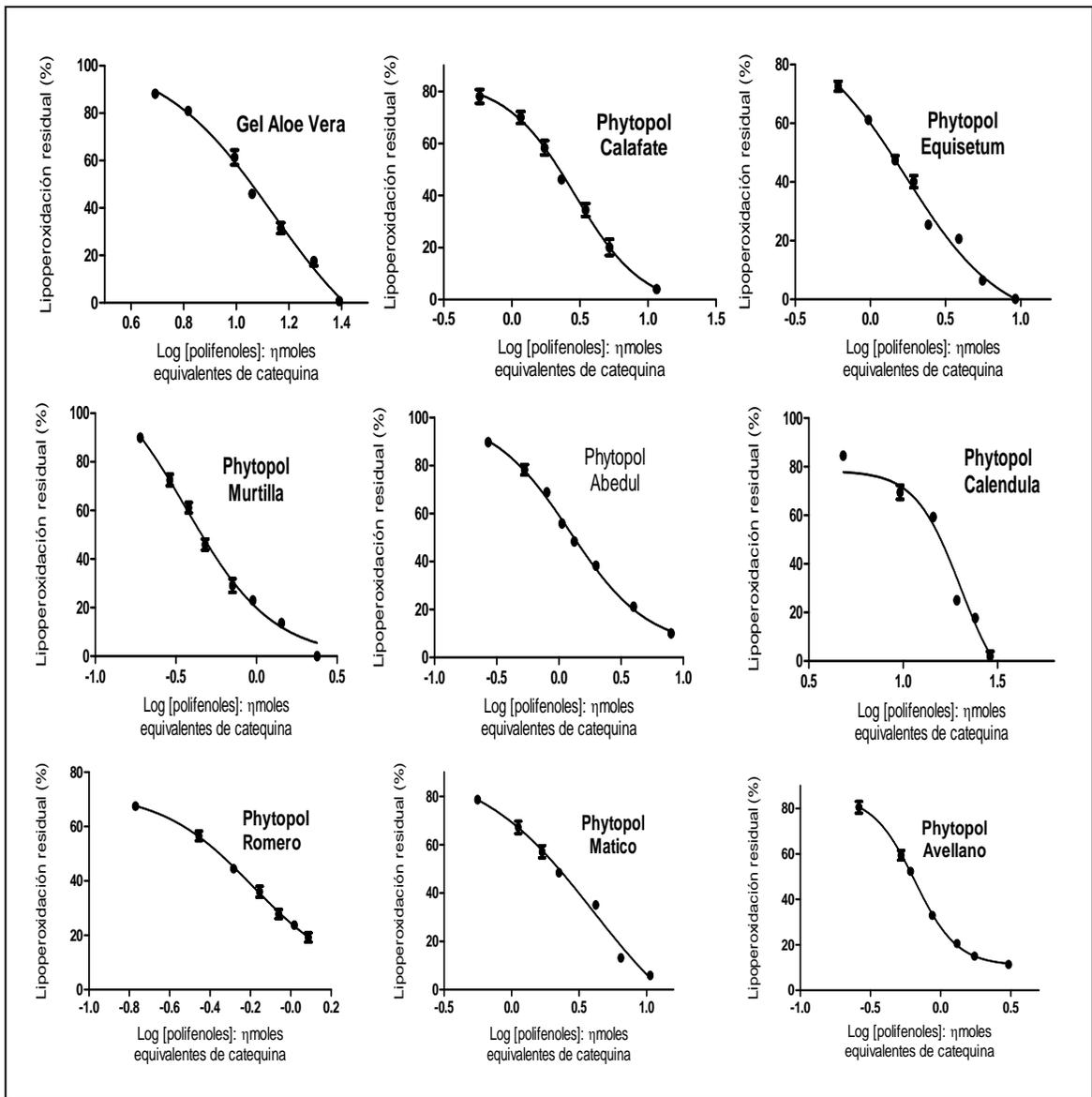


Figura 2. Gráficos semilogarítmicos de la lipoperoxidación microsómica inducida por el sistema Cu^{2+} /ascorbato en presencia de los extractos herbales. Los gráficos muestran el logaritmo de las concentraciones ensayadas de los extractos *versus* el porcentaje de lipoperoxidación residual; esta fue calculada considerando como 100% aquella obtenida en ausencia de extracto. El ensayo de lipoperoxidación se realizó de acuerdo a lo descrito en Métodos. Los valores representan el promedio de al menos 3 experimentos independientes \pm DE.

Tabla N° 2. Efecto comparativo de los extractos herbales sobre la lipoperoxidación microsómica inducida por el sistema Cu²⁺/ascorbato

Extracto	EC₅₀
Phytopol Romero	0,44
Phytopol Murtilla	0,45
Phytopol Avellano	0,63
Phytopol Abedul	1,3
Phytopol Equisetum	1,4
Phytopol Calafate	2,2
Phytopol Matico	2,2
Gel Aloe Vera	11,2
Phytopol Caléndula	14,8

EC₅₀: concentración de extracto que previene en un 50% la lipoperoxidación microsómica inducida por Cu²⁺/ascorbato. EC₅₀: ηmoles equivalentes de catequina /0,5 mg de proteína microsómica. Los valores fueron obtenidos de los gráficos semilogarítmicos que aparecen en la Figura 2, los cuales se construyeron a partir de los valores experimentales que se muestran en la Figura 1. Los valores experimentales representan el promedio de al menos 3 experimentos independientes ± DE.

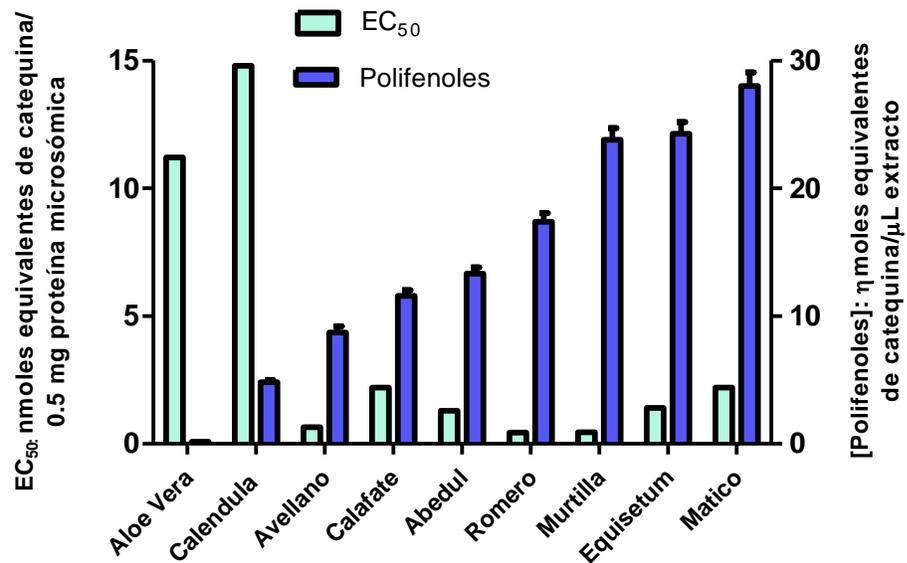


Figura 3. EC₅₀ de la lipoperoxidación microsómica *versus* la concentración de polifenoles de los extractos. Los valores de EC₅₀ fueron obtenidos de las curvas semilogarítmicas, en las cuales se graficó % de lipoperoxidación residual vs logaritmo de la concentración de polifenoles expresada como nmoles equivalentes de catequina. Los valores de concentración de polifenoles representan el promedio de al menos 4 determinaciones ± DE.

Prevención de la oxidación de tioles microsómicos inducida por el sistema Cu^{2+} /ascorbato. En la Figura 4 se muestran los resultados obtenidos al evaluar la capacidad antioxidante de los extractos herbales en la prevención de la oxidación de tioles microsómicos. Para ver el efecto de estos extractos en la prevención de la oxidación de tioles microsómicos se utilizaron las concentraciones EC_{80} obtenidas en la lipoperoxidación microsómica de cada extracto. El control contenía $31,2 \pm 2,14$ ηmoles de tioles//0,5 mg de proteína microsómica. En presencia del sistema Cu^{2+} /ascorbato el contenido de tioles microsómicos disminuyó a $20,0 \pm 2,24$. Al preincubar los microsomas hepáticos de rata con los diferentes extractos y luego el sistema Cu^{2+} /ascorbato la diferencia entre los microsomas control y los microsomas tratados con Cu^{2+} /ascorbato, disminuyó. Los resultados de menor a mayor efecto fueron Phytopol Abedul, $21,6 \pm 0,41$; Phytopol Romero, $22,3 \pm 0,95$; Phytopol Avellano, $22,7 \pm 0,81$; Phytopol Murtilla, $24,0 \pm 2,65$; Phytopol Equisetum, $24,2 \pm 2,54$; Phytopol Caléndula, $27,6 \pm 0,28$; Phytopol Calafate, $28,6 \pm 2,10$; Phytopol Matico, $28,7 \pm 0,41$. Cabe señalar que el extracto de Gel Aloe Vera no mostró efecto preventivo sobre la oxidación de tioles microsómicos disminuidos por el sistema Cu^{2+} /ascorbato (dato no mostrado).

Reversión de la oxidación de tioles microsómicos inducida por el sistema Cu²⁺/ascorbato. La capacidad de los extractos herbales de revertir la oxidación de los tioles microsómicos inducida por el sistema Cu²⁺/ascorbato se muestra en la Figura 5. En este caso se utilizaron concentraciones iguales para todos los extractos (10 µL de extracto/0,5 mg de proteína microsómica). Los tioles microsómicos hepáticos disminuidos por la oxidación mediada por el sistema Cu²⁺/ascorbato, aumentaron al adicionar 7 de los extractos herbales ensayados; Aloe Vera y Avellano no mostraron este efecto (datos no mostrados). Así, el control contenía $39,8 \pm 1,15$ ηmoles de tioles/0,5 mg de proteína microsómica, valor disminuido a $27,6 \pm 0,56$ por el sistema Cu²⁺/ascorbato. Para todos los otros extractos se observó un efecto en la reversión de la oxidación de tioles microsómicos, estos resultados fueron de menor a mayor efecto: Phytopol Murtila, $29,5 \pm 0,83$; Phytopol Equisetum, $30,7 \pm 0,68$; Phytopol Abedul, $32,0 \pm 0,45$; Phytopol Calafate, $32,2 \pm 0,65$; Phytopol Romero, $35,9 \pm 0,86$; Phytopol Caléndula, $39,6 \pm 0,12$ y Phytopol Matico, $39,8 \pm 0,03$.

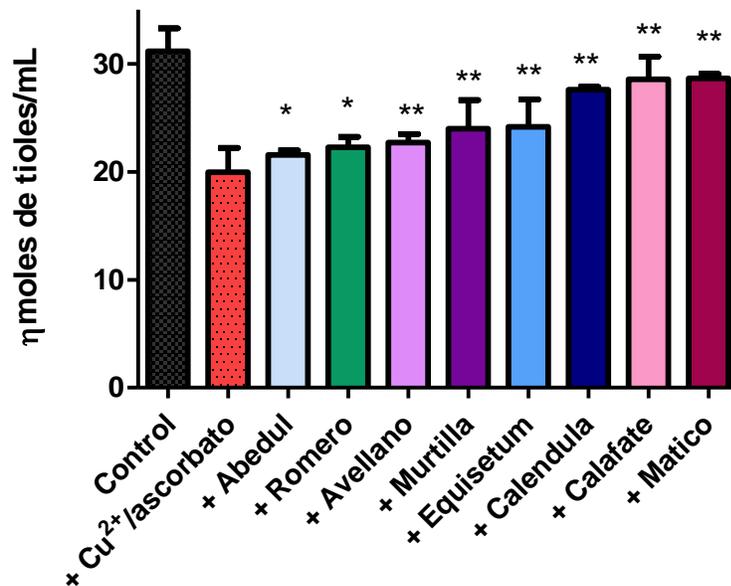


Figura 4. Prevención de la oxidación de tioles microsómicos inducida por el sistema Cu²⁺/ascorbato. [Microsomas]: 0,5 mg /mL. Las concentraciones de los extractos ensayadas fueron las correspondientes a los EC₈₀ obtenidos de la lipoperoxidación microsómica: Aloe Vera: 110 μL; Calafate: 0,5 μL; Equisetum: 0,1 μL; Murtilla: 0,04 μL; Abedul: 0,3 μL; Caléndula: 5 μL; Romero: 0,07 μL; Matico: 0,2 μL; Avellano: 0,1 μL. Los microsomas fueron preincubados 5 min a 37 °C con los diferentes extractos y luego 20 min con Cu²⁺/ascorbato antes de adicionar el DTNB y cuantificar los tioles microsómicos de acuerdo a lo descrito en Métodos. Los valores representan el promedio de al menos 4 experimentos independientes ± DE. * Valores no significativamente diferentes a + Cu²⁺/ascorbato, *p*>0,05. ** Valores significativamente diferentes a + Cu²⁺/ascorbato, *p*<0,05.

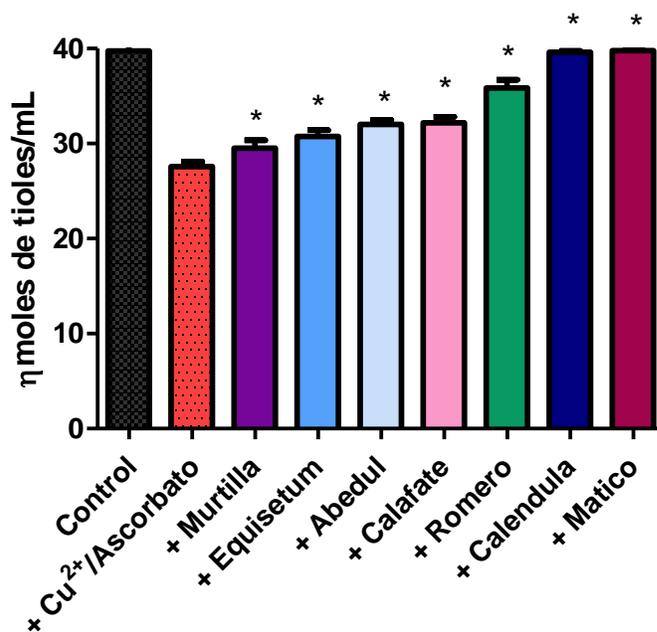


Figura 5. Reversión de la oxidación de tioles microsómicos inducida por el sistema Cu^{2+} /ascorbato. [Microsomias]: 0,5 mg de proteína/mL [Extractos herbales]: 10 μL /0,5 mg de proteína microsómica. Los microsomas fueron preincubados 5 min a 37 °C con Cu^{2+} /ascorbato y luego, 20 min con los extractos, antes de adicionar el DTNB para cuantificar los tioles microsómicos de acuerdo a lo descrito en Métodos. Los valores representan el promedio de al menos 4 experimentos independientes \pm DE. *: Valores significativamente diferentes a + Cu^{2+} /ascorbato, $p < 0,05$.

Capacidad quelante de Cu^{2+} de los diferentes extractos. La Figura 6A muestra los espectros de absorbancia de una solución de CuSO_4 0,5 mM en ausencia y presencia del extracto de Calafate. El CuSO_4 presenta un pico de absorbancia entre 241 nm con una absorbancia máxima de 1,224 Unidades de absorbancia (UA). Al adicionar 10 μL de extracto de Calafate a la solución de CuSO_4 0,5 mM, se observó una disminución de la absorbancia a 241 nm y la aparición de un nuevo pico a 380 nm. La adición de 20 μL de este extracto disminuyó aún más la absorbancia a 241 nm y aumentó aquella observada a 380 nm. Similares modificaciones del espectro del CuSO_4 se obtuvieron con los extractos Phytopol Murtilla, Phytopol Caléndula, Phytopol Matico y Phytopol Avellano.

La Figura 6B muestra el espectro de absorbancia del CuSO_4 0,5 mM en ausencia y presencia de 10 μL y 20 μL del extracto Equisetum. En este caso, la presencia del extracto provocó la aparición de dos picos de absorbancia en la región 240-250 nm y la aparición de un tercer pico en la región de 380 nm. Este tipo de espectro fue también obtenido con los extractos Phytopol Abedul y Phytopol Romero. Cabe destacar, que los picos de absorbancia que aparecen en la región 240-250 nm coinciden con la región del espectro en la cual aparece el pico de la solución de CuSO_4 .

Cabe señalar además, que el extracto de Aloe Vera no provocó cambios en el espectro de absorbancia de la solución de CuSO_4 0,5 mM. Nuevos experimentos están en desarrollo para cuantificar este efecto.

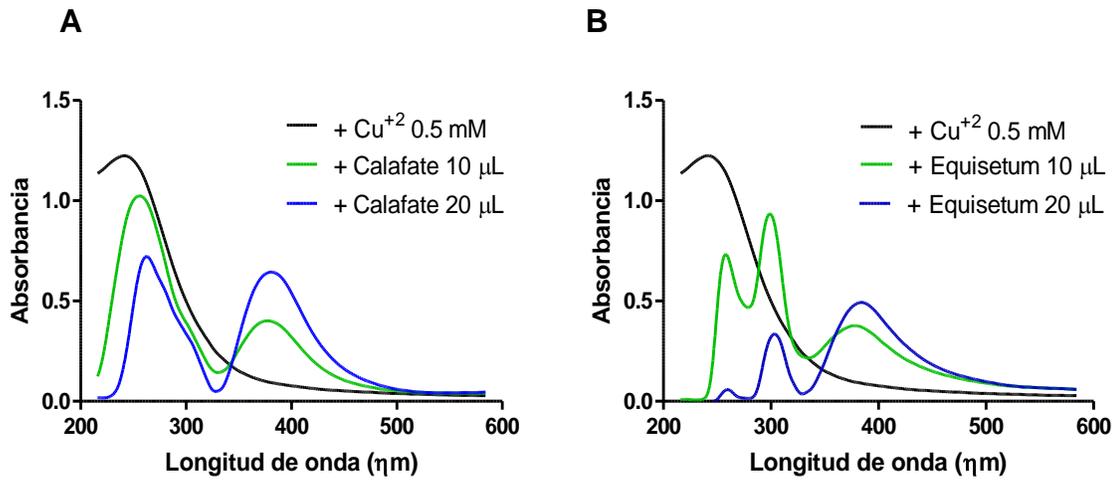


Figura 6. Modificación del espectro de absorbancia de Cu²⁺ en presencia de los extractos herbales. [CuSO₄]: 0,5 mM. La figura representa el espectro experimental obtenido con los extractos de Calafate (6A) y Equisetum (6B).

Actividad GSH-transferásica microsómica en presencia de los extractos herbales. La Figura 7 muestra los resultados experimentales observados al medir la velocidad de formación del complejo GSH-DNB catalizado por la GSH-transferasa en ausencia y presencia de los extractos herbales. En ella se observa las diferentes rectas obtenidas al medir la actividad GSH-transferásica en ausencia y presencia de los diferentes extractos herbales ensayados. La pendiente de estas rectas representa la absorbancia del conjugado formado/min que corresponde a la velocidad de formación del conjugado y se muestran en la Tabla 3. Todos los extractos disminuyeron la pendiente de la recta control (actividad GSH-transferásica medida en ausencia de extracto).

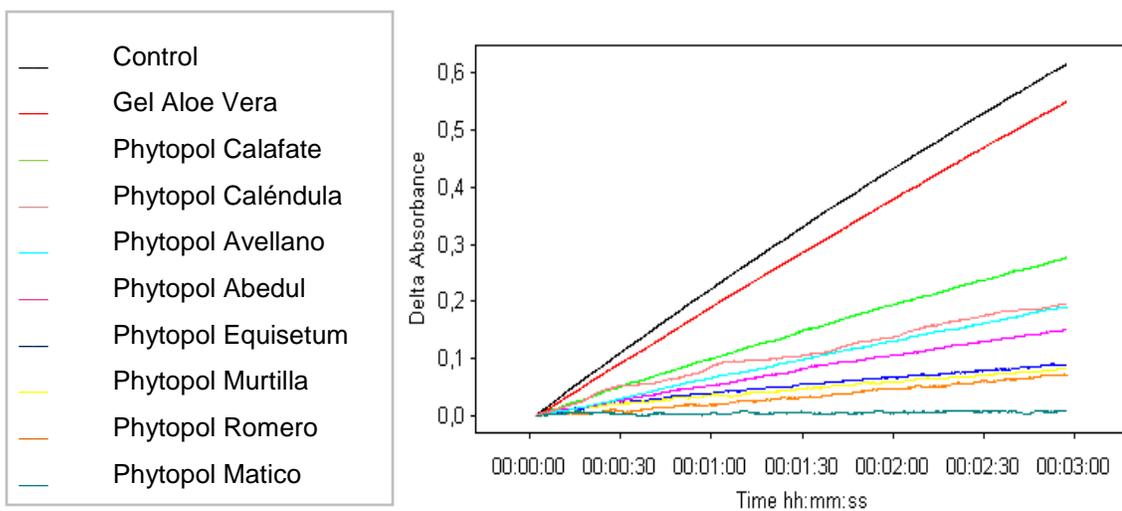


Figura 7. Pendientes de formación del conjugado GSH-DNB en ausencia y presencia de los extractos herbales. Datos experimentales obtenidos de la medición continua durante 3 minutos de la absorbancia a 340 nm que corresponde a la absorbancia máxima del conjugado GSH-DNB. Control: actividad medida en ausencia de extracto.

Tabla 3. Valor de las pendientes de las rectas de la Figura 5

Condiciones	Pendiente
Control	0,21± 0,001
Gel Aloe Vera	0,19 ± 0,003
Phytopol Calafate	0,094 ± 0,001
Phytopol Caléndula	0,066 ± 0,001
Phytopol Avellano	0,064 ± 0,001
Phytopol Abedul	0,051 ± 0,002
Phytopol Equisetum	0,029 ± 0,002
Phytopol Murtilla	0,026 ± 0,002
Phytopol Romero	0,025 ± 0,002
Phytopol Matico	0,002 ± 0,0005

Los valores de pendiente corresponden a los valores experimentales expresados en absorbancia/min/0,1 mg de proteína microsómica. Cada valor representa el promedio de al menos 4 experimentos independientes ± DE

Los valores de velocidad de formación del conjugado expresada en η moles de conjugado formado/min/ mg de proteína microsómica se muestran en la Tabla 4. En ella se observa que el Gel Aloe Vera fue el extracto que provocó el menor efecto inhibitorio sobre la actividad GSH-transferásica microsómica y el Phytopol matico, el que provocó el mayor efecto inhibitorio.

Tabla 4. Velocidad de formación del conjugado GSH-DNB en presencia de los diferentes extractos

Condiciones	V
Control	218,8 \pm 1,3
Gel Aloe Vera	197 \pm 3,0
Phytopol Calafate	97,7 \pm 1,1
Phytopol Caléndula	68,7 \pm 1,3
Phytopol Avellano	66,8 \pm 1,2
Phytopol Abedul	53,5 \pm 1,6
Phytopol Equisetum	30,2 \pm 2,3
Phytopol Murtilla	27,0 \pm 2,5
Phytopol Romero	26,0 \pm 2,6
Phytopol Matico	2,1 \pm 0,5

[Concentración de extracto]: 10 μ L/0,1 mg de proteína microsómica. V: η moles de conjugado formado/min/mg de proteína microsómica. La actividad GSH-transferásica se determinó de acuerdo a lo descrito en Métodos. Cada valor representa el promedio de al menos 4 mediciones independientes \pm DS.

La Figura 8 muestra un gráfico de dos variables, la capacidad de los extractos de revertir la oxidación de los tioles microsómicos y su capacidad de inhibir la actividad GSH-transferásica microsómica. En ella se observa que el extracto que tiene la menor cantidad de polifenoles (Gel Aloe Vera), no fue capaz de revertir la oxidación de los tioles microsómicos y mostró un leve efecto inhibitorio de la actividad GSH-transferásica ensayada. Asimismo, el extracto de matico que presentó el mayor contenido de polifenoles y el mayor efecto sobre la reversión de la oxidación de los tioles microsómicos, también mostró el mayor efecto inhibitorio sobre la actividad GSH-transferásica (aproximadamente 100%SH-transferásica). El resto de los extractos herbales ensayados, si bien fueron capaces de revertir la oxidación de los tioles microsómicos e inhibir la actividad GSH transferásica, no existe una correlación directa entre ambas actividades ensayadas.

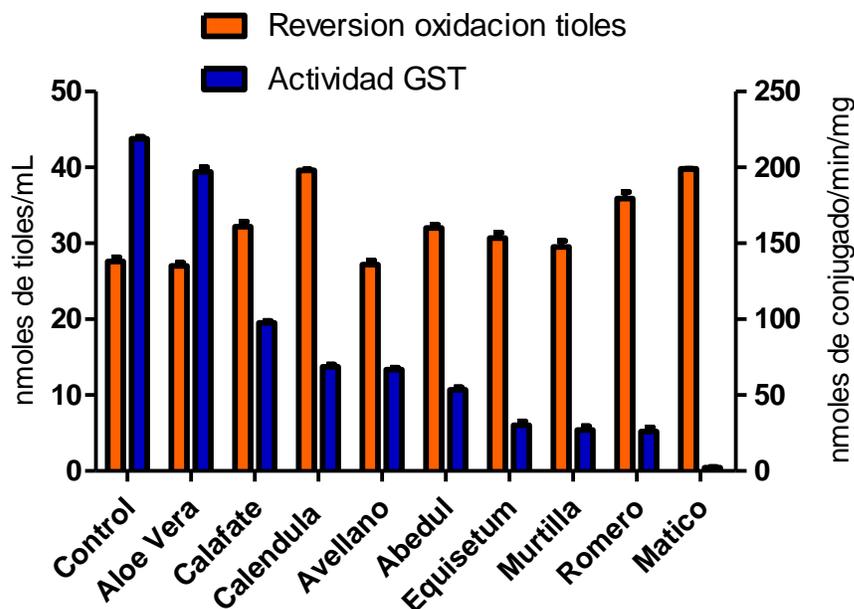


Figura 8. Inhibición de la actividad GSH-transferásica *versus* reversión de la oxidación de tioles microsómicos. Los valores de “reversión oxidación de tioles” se obtuvieron de la Figura 5 y los de “actividad GST”, de la Tabla 4.

IV. DISCUSIÓN

Los preparados herbales pueden ser una de las estrategias terapéuticas frente a enfermedades asociadas a estrés oxidativo, entre ellas, el cáncer y aquellas relacionadas con el envejecimiento. La actividad antioxidante de los fitofármacos está dada por el contenido y tipo de antioxidantes presentes en ellos. Los compuestos antioxidantes mayoritarios en los preparados herbales comerciales son los polifenoles ya que ellos son preparados principalmente de las hojas de las plantas. Estudios con compuestos polifenólicos purificados son bastante abundantes en la literatura; sin embargo, estos estudios son escasos en preparados herbales polivalentes.

En la célula animal el GSH es el compuesto antioxidante no enzimático más abundante. Compuestos antioxidantes azufrados como GSH también están presentes en plantas. La mayoría de las proteínas tienen en su estructura cisteína, aminoácido tiólico que generalmente está involucrado en la conformación nativa y/o en la expresión de la actividad biológica de las proteínas. El funcionamiento de muchos procesos fisiológicos de los seres vivos está dado por la homeostasis de los circuitos tiólicos. El grupo tiólico puede ser reversiblemente oxidado a disulfuro (-S-S-), fenómeno redox que puede aumentar o inhibir la actividad biológica de una proteína.

Cabe destacar que existen diferentes preparados comerciales de una misma planta. Esto implica que la concentración y actividad de los antioxidantes presentes en ellos no necesariamente es la misma. Es por ello, que en este trabajo nos interesó evaluar la actividad antioxidante de diferentes extractos herbales preparados por Laboratorios Ximena Polanco. Al inicio de este estudio, de ellos, sólo se recibió el nombre de la planta que les dio origen; su caracterización realizada por la empresa fue recibida al final de este trabajo. A excepción del Gel Aloe Vera extraído directamente de la pulpa de las hojas de

la planta, los ocho extractos restantes fueron preparados en mezcla con glicerol y se les denominó como “Phytopoles”.

Como era de esperar, el contenido de polifenoles fue diferente para todos los extractos herbales, siendo el extracto Gel Aloe Vera el que presentó la menor concentración y el Phytopol matico, el que presentó la mayor concentración (Tabla 1). Al analizar las actividades redox observamos algunas correlaciones interesantes que pasamos a exponer. El Gel Aloe Vera presentó un leve efecto antioxidante. Así, este extracto previno la lipoperoxidación microsómica levemente ya que se necesitaron 70 μL de extracto para obtener el valor de EC_{50} comparado con los extractos de romero y matico, cuyos valores fueron 0,08 y 0,02 μL , respectivamente. Más aún, el Gel Aloe Vera no fue capaz de prevenir ni de revertir la oxidación de los tioles microsómicos, no modificó el espectro del CuSO_4 a ninguna de las concentraciones ensayadas (10 y 20 $\mu\text{L}/\text{mL}$) y levemente inhibió la actividad GSH-transferásica. Probablemente, esta baja actividad esta relacionada con su baja concentración de polifenoles y la presencia de mucílagos, los que podrían otorgarle propiedades protectoras de membrana. Los mucílagos pueden interactuar con residuos aminoacídicos de las proteínas de membrana, en este caso la membrana microsómica, ejerciendo así, un efecto pantalla sobre los componentes de la membrana microsómica, impidiendo cualquier interacción química con ellos.

Como se mencionó antes, el extracto con mayor contenido de polifenoles fue el Phytopol Matico (Tabla 1), sin embargo este extracto no mostró el mejor efecto antilipoperoxidante, fue el Phytopol Romero (Tabla 2). Estos resultados muestran que el contenido total de polifenoles no sería el único responsable de la actividad antilipoperoxidante de estos extractos. Cabe recordar que la medicina nativa utiliza los extractos de hojas de romero como hepatoprotector y emenagogo, ambos efectos sistémicos, comparado con el efecto local

cicatrizante de heridas del matico. Esta diferencia podría deberse a las propiedades físico-químicas de los principios antioxidantes presentes en ambos extractos; es decir, estos principios en el romero serían más lipofílicos que los del matico y por lo mismo, tendrían mayor afinidad por los lípidos de la membrana microsómica que aquellos del matico. Cabe señalar además, que los polifenoles no son los únicos principios antioxidantes presentes en las plantas, por ejemplo, ellas también contienen compuestos azufrados.

Similares resultados a los de matico y romero se observaron con los extractos de murtila y romero; ambos extractos presentaron el mismo EC_{50} frente a la lipoperoxidación, sin embargo, el extracto de romero posee menor cantidad de polifenoles que la murtila (17,4 versus 23,8 μ moles equivalentes de catequina/ μ L de extracto) (Figura 3). Este resultado apoya el postulado propuesto que dice relación con las diferentes variables que deben ser consideradas para evaluar la actividad antioxidante de un preparado herbal polivalente como los extractos ensayados en este trabajo.

El análisis de los resultados de los experimentos relacionados con la prevención y la reversión de la oxidación de los tioles proteicos microsómicos, mostró también una falta de correlación entre esta actividad redox y la concentración de polifenoles de los extractos. Respecto de la reversión de la oxidación de los tioles microsómicos, cabe recordar que biológicamente los compuestos tiólicos son capaces de reducir enlaces disulfuros, reacción redox por lo tanto, reversible. En cambio, la oxidación de fenoles a compuestos quinónicos no es revertida por polifenoles. Al respecto, Phytopol Matico fue el extracto que mostró la mayor capacidad para prevenir y revertir la oxidación de tioles microsómicos. El extracto Phytopol Calafate mostró un efecto similar al Phytopol Matico en la prevención de la oxidación de tioles microsómicos y fue capaz de revertir en menor grado esta oxidación (Figuras 4 y 5). Phytopol

Caléndula mostró similares resultados para prevenir y revertir la oxidación de los tioles microsómicos. El extracto Phytopol Avellano tuvo una baja capacidad de prevenir la oxidación de tioles microsómicos y no fue capaz de revertir este efecto. El extracto Phytopol Romero mostró un mejor efecto en la reversión de la oxidación de tioles microsómicos que en la prevención de su oxidación (Figuras 4 y 5). Las diferencias observadas podrían deberse a que el mecanismo principalmente involucrado en la prevención sería el atrapamiento de los radicales libres generados por el sistema Cu^{2+} /ascorbato. En cambio, en la reversión de la oxidación de tioles microsómicos estarían involucrados compuestos con un potencial reductor capaz de reaccionar con los disulfuros provenientes de la oxidación de los tioles microsómicos.

Otro de los mecanismos antioxidantes importantes para la célula es la capacidad de algunos compuestos de quelar metales redox activos como son los iones libres de hierro y cobre, los cuales en su estado reducido pueden generar EROs. En este trabajo se probó una técnica cualitativa para probar la capacidad de los diferentes extractos herbales de quelar iones Cu^{+2} . Se utilizó una solución de CuSO_4 0,5 mM y se siguió el pico de absorbancia máxima a 241 nm del ión cúprico en ausencia y presencia de diferentes concentraciones de los extractos. El espectro de absorbancia medido entre 200 y 600 nm fue modificado por los extractos, fenómeno que se presentó en dos formas: a) disminución del pico de absorbancia a 241 nm y aparición de un nuevo pico a 380 nm; b) transformación del pico de absorbancia a 241 nm en dos picos de menor absorbancia máxima que la del Cu^{2+} y la aparición de un nuevo pico a 380 nm. Estos cambios espectrales se ejemplificaron con los espectros de Phytopol Calafate (Figura 6A) y de Phytopol Equisetum (Figura 6B), respectivamente. Si bien este experimento no cuantifica la capacidad quelante de los extractos, nos muestra cambios en el espectro del CuSO_4 que podrían deberse a la quelación de iones Cu^{+2} por los compuestos presentes en ellos.

Estos resultados muestran también diversidad en el tipo de compuestos que podrían actuar como antioxidantes mediante el mecanismo de quelación de iones metálicos. Nuevos experimentos se están desarrollando que permitan cuantificar la actividad quelante de preparados herbales.

Los circuitos tiólicos están involucrados en múltiples funciones fisiológicas. En el retículo endoplásmico existe una isoforma de la GSH-transferasa, cuya forma nativa activa es el dímero -S-S-, por lo tanto la reducción de este enlace provoca la disminución de la forma activa microsómica de esta enzima. En este trabajo se probó la capacidad de los diferentes extractos herbales de inhibir la actividad catalítica de la GSH-transferasa midiendo la formación del complejo 1-Cl-2,4-dinitrobenzeno (DNB) -GSH por espectrofotometría. El extracto que mostró la mejor actividad inhibitoria fue el Phytopol Matico (Figura 7), mostrando una inhibición cercana al 100%, lo cual se observa en la Figura 7 y Tabla 3. al analizar la pendiente experimental de actividad enzimática (absorbancia del conjugado/min). Le siguieron en actividad inhibitoria el Phytopol Murtilla y el Phytopol Romero, disminuyendo en forma similar la pendiente de formación del conjugado DNB-GSH. La capacidad de los extractos de inhibir la capacidad del conjugado DNB-GSH se comparó con la capacidad de los mismos de revertir la oxidación de los tioles microsómicos (Figura 8). Al analizar estos datos se observa que todos los extractos en diferente extensión tendrían capacidad reductora del enlace disulfuro de la forma activa de la enzima GST. Sin embargo, no todos los extractos fueron capaces de revertir la oxidación de los tioles microsómicos, como por ejemplo el Gel Aloe Vera y el extracto de avellano, indicando con esto que aparentemente no existe correlación directa entre ambas actividades. Ambos ensayos están relacionados con la reducción de enlaces disulfuros; sin embargo, las características físico-químicas de los principios antioxidantes presentes en los extractos juegan un

rol importante en la cuantificación de las actividades biológicas ensayadas, más aún cuando ellas están presentes en membranas biológicas.

Los resultados presentados refuerzan nuestro postulado: “la diversidad de compuestos redox activos en los extractos herbales sería la causa principal de las diferencias en la prevención como en la reversión del desbalance redox provocado por el sistema Cu^{2+} /ascorbato”. Cabe hacer notar que antecedentes no publicados aún de nuestro laboratorio han mostrado la escasa capacidad de algunos polifenoles purificados como catequina y quercetina de reducir enlaces disulfuros. De aquí que pensamos que probablemente los extractos que mostraron alto poder inhibitorio de la actividad GSH-transferásica podrían contener compuestos con un potencial redox mayor capaz de reducir el dímero S-S de la GSH- transferasa.

CONCLUSIÓN

El extracto Gel Aloe Vera presentó la menor concentración de polifenoles. Asimismo, este extracto presentó un bajo efecto antioxidante: previno levemente la lipoperoxidación microsómica, no fue capaz de prevenir ni de revertir la oxidación de tioles microsómicos, no modificó el espectro del CuSO_4 e inhibió levemente la actividad GSH- transferásica.

Entre los Phytopoles, los extractos de matico, murtila y equisetum mostraron el mayor contenido de polifenoles. Sin embargo, no hubo correlación entre este contenido y la capacidad antioxidante de ellos sobre la protección de las biomoléculas microsómicas ensayadas.

Si bien este es un estudio preliminar, los resultados presentados muestran la diversidad de mecanismos antioxidantes celulares que extractos polivalentes podrían llevar a cabo, protegiendo así al organismo del estrés oxidativo, fenómeno que acompaña en general a todas las patologías.

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] 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.
- [4] 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.
- [5] 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.
- [6] Bors W, Michel C (2002) Chemistry of the antioxidant effect of polyphenols. *Ann N Y Acad Sci* 957: 57-69.
- [7] Fraga CG, Galleano M, Verstraeten SV, Oteiza PI (2010) Basic biochemical mechanisms behind the health benefits of polyphenols. *Mol Aspects Med* 31: 435-445.
- [8] Sies H (2010) Polyphenols and health: update and perspectives. *Arch Biochem Biophys* 501: 2-5.
- [9] Schafer FQ, Buettner GR (2001) Redox environment of the cell as viewed through the redox state of the glutathione disulfide/glutathione couple. *Free Radic Biol Med* 30: 1191-1212.
- [10] Wu G, Fang YZ, Yang S, Lupton JR, Turner ND (2004) Glutathione metabolism and its implications for health. *J Nutr* 134: 489-492.

- [11] Jones DP (2008) Radical-free biology of oxidative stress. *Am J Physiol Cell Physiol* 295: C849-868.
- [12] Newcomb M, Chandrasena RE (2005) Highly reactive electrophilic oxidants in cytochrome P450 catalysis. *Biochem Biophys Res Commun* 338: 394-403.
- [13] Klaassen CD, Reisman SA (2010) Nrf2 to the rescue: effects of the antioxidative/electrophilic response on the liver. *Toxicol Appl Pharmacol* 244: 57-65.
- [14] Lo Pachin RM, Barber DS (2006) Synaptic cysteine sulfhydryl groups as targets of electrophilic neurotoxicants. *ToxicolSci* 94: 240-255.
- [15] van Welie RT, van Dijck RG, Vermeulen NP, van Sittert NJ (1992) Mercapturicacids, protein adducts, and DNA adducts as biomarkers of electrophilic chemicals. *Crit Rev Toxicol* 22: 271-306.
- [16] Coles BF, Kadlubar FF (2003) Detoxification of electrophilic compounds by glutathione S-transferase catalysis: determinants of individual response to chemical carcinogens and chemotherapeutic drugs? *Biofactors* 17: 115-130.
- [17] Armstrong RN (1997) Structure, catalytic mechanism, and evolution of the glutathione transferases. *Chem Res Toxicol* 10: 2-18.
- [18] Rinaldi R, Eliasson E, Swedmark S, Morgenstern R (2002) Reactive intermediates and the dynamics of glutathione transferases. *Drug Metab Dispos* 30: 1053-1058.
- [19] Masella R, Mazza G (2009) Glutathione and sulfur amino acids in human health and disease. Wiley, Hoboken.

- [20] Banerjee R (2008) Redox biochemistry. Wiley-Interscience, Hoboken, N.J.
- [21] Wouters MA, Fan SW, Haworth NL (2010) Disulfides as redox switches: from molecular mechanisms to functional significance. *Antioxid Redox Signal* 12: 53-91.
- [22] Letelier ME, Molina-Berrios A, Cortes-Troncoso J, Jara-Sandoval J, Müller A, Aracena-Parks P (2010) Comparative effects of superoxide anion and hydrogen peroxide on microsomal and cytosolic glutathione S-transferase activities of rat liver. *Biol Trace Elem Res* 134:203-211.
- [23] Letelier ME, Pimentel A, Pino P, Lepe AM, Faúndez M, Aracena P, Speisky H (2005) Microsomal UDP-Glucuronyl transferase in Rat Liver: Oxidative Activation. *Basic Clin Pharmacol Toxicol* 96: 480–486.
- [24] Hayes JD, Flanagan JU, Jowsey IR (2005) Glutathione transferases. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 45:51-88.
- [25] Habig WH, Pabst MJ, Jakoby WB (1974) Glutathione S-transferases: The first enzymatic step in mercapturic acid formation. *J Biol Chem* 249:7130-7139.
- [26] Aniya Y, Anders MW (1992) Activation of rat liver microsomal glutathione S-transferase by hydrogen peroxide: role for protein-dimer formation. *Arch Biochem Biophys* 296:611-616.
- [27] Letelier ME, Sánchez-Jofré S, Peredo-Silva L, Cortés-Troncoso J, Aracena-Parks P (2010) Mechanisms underlying iron and copper ions toxicity in biological systems: Pro-oxidant activity and protein-binding effects. *Chem Biol Interact* 188: 220-227.
- [28] Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ (1951) Protein measurement with the Folin Phenol reagent. *J Biol Chem* 193: 265-275.

- [29] Letelier ME, Terán A, Barra M, Aracena-Parks P (2009) Antioxidant properties of *Rosmarinus officinalis* and its effects on xenobiotic biotransformation. *Boletín Latinoamericano y del Caribe de Plantas Medicinales y Aromáticas* 8:487-497
- [30] Letelier ME, Lepe AM, Faúndez M, Salazar J, Marín R, Aracena P, Speisky H (2005) Possible mechanisms underlying copper-induced damage in biological membranes leading to cellular toxicity. *Chemico-Biological Interactions* 151: 71–82.