

BOLETÍN LATINOAMERICANO Y DEL CARIBE DE PLANTAS MEDICINALES Y AROMÁTICAS

Publicación Electrónica Bimestral Registrada en **LATINDEX**

ISSN 0717 7917

Marzo de 2005 Volumen 4 Número 2



**"Desde el Río Grande a la Patagonia,
incluyendo el Caribe de habla Española, Inglesa y Francesa"**

Editores

Jefe: José L. Martínez (Chile)
Asociado: Jorge Rodríguez (Cuba)
Ejecutivo: José M. Prieto (España)

Supervisores de Edición

Patricia Landázuri (Colombia)
Gabino Garrido (Cuba)

Co-editores

Arnaldo Bandoni (Argentina)
María E. Medina (Nicaragua)
Francisco Morón (Cuba)
Patrick Moyna (Uruguay)

Presidente de la SLF (2002 -2005)

Virginia Martino (Argentina)

Bajo el auspicio de la



Sociedad Latinoamericana de Fitoquímica

Consejo Editorial

Christian Agyare (Ghana)
Jorge Alonso (Argentina)
Pastor Arenas (Argentina)
Elizabeth Barrera (Chile)
Henry Y. Bernal (Colombia)
Armando Cáceres (Guatemala)
Bruce Cassels (Chile)
Geoffrey Cordell (EUA)
Marco Dehesa (Ecuador)
Carla Delporte (Chile)
Pilar D'Ocón (España)
Luis Doreste (Venezuela)
Angela Duque (Colombia)
Norman R. Farnsworth (EUA)
Mildred García (Costa Rica)
Martha Gatusso (Argentina)
Mahabir Gupta (Panamá)
Alberto Hernández (Cuba)
Peter Houghton (Reino Unido)
Ana Ladio (Argentina)
Ingrid Loayza (Bolivia)
Olga Lock (Perú)
Vicente Martínez (Guatemala)
Ernesto Medina (Nicaragua)
Pedro Melillo de Magalhaes (Brasil)
Jordi Molgó (Francia)
Miguel Morales (Chile)
John A. O. Ojewole (Sudáfrica)
Mahendra Rai (India)
Rosalía Ramírez (México)
Elsa Rengifo (Perú)
Alicia Rodríguez (Cuba)
Carles Roersch (República Dominicana)
Marcela Samarotto (Chile)
Aurelio San Martín (Chile)
José San Martín (Chile)
Marco Schwartz (Chile)
Nikolai Sharapin (Brasil)
Mario Silva (Chile)
Djaja D. Soejarto (EUA)
Mauricio Venegas (Chile)
Carlos Vicente (Argentina)
Roger Villalobos (Costa Rica)
Rita Zeichen (Argentina)
Xing Zu Zhu (República Popular China)
Gustavo Zúñiga (Chile)

Objetivos del Boletín



Estimular a los grupos de trabajo existentes en Latinoamérica, sean investigadores, productores, funcionarios o simplemente interesados en las plantas medicinales y aromáticas, poniendo a su disposición este Boletín para la difusión y la divulgación de sus investigaciones y de las actividades que en general desarrollen en torno a plantas.

Ser una herramienta de difusión para la Sociedad Latinoamericana de Fitoquímica principalmente y de otras sociedades y agrupaciones que se sientan representadas por este Boletín.

Constituir un nexo entre los profesionales de habla hispana, francesa, portuguesa e inglesa de la región, relacionados con el tema central del Boletín

Índice

Editorial (Dr. Mahendra Rai).....	25
La columna de Michael Heinrich	26
Eventos	27
Artículo Original	
Evaluación de dos metodologías para determinar la actividad de plantas medicinales J. J. Rojas, A. M. García, A. J. López.....	28
Artículo Original	
Actividad antioxidante de infusos de <i>Ugni molinae</i> Turcz ("Murtilla"). M. Avello y E. Pastene	33



Instrucciones para los autores

EL BOLETÍN LATINOAMERICANO Y DEL CARIBE DE PLANTAS MEDICINALES Y AROMÁTICAS (BLACPMA), es una publicación científica electrónica bimensual dirigida a diversos profesionales y técnicos vinculados al campo de las plantas medicinales y aromáticas. Se aceptarán trabajos relacionados con las áreas que cubre el Boletín y que son: agronomía, antropología y etnobotánica, aplicaciones industriales, botánica, calidad y normalización, ecología y biodiversidad, economía y mercado, farmacología, fitoquímica, legislación, informaciones y difusión de eventos, cursos, premios, reglamentaciones, noticias, cuestiones de mercado, ponencias, bibliografía, o cualquier otro tipo de material que se crea importante comunicar.

Se podrán presentar trabajos referativos y de investigación científica, y comunicaciones cortas, escritos en idioma español, inglés, portugués o francés. La extensión máxima será de 5 cuartillas para los trabajos referativos y de investigaciones científicas y de 3 cuartillas para las comunicaciones cortas. Los anuncios, noticias y otros no deberán exceder la cuartilla. En todos los casos están incluidas las tablas.

Los trabajos serán presentados en lenguaje de Microsoft Word (versión 3.1 o superior, con letra arial número 12) y enviados por correo electrónico a la siguiente dirección: pulpito@entelchile.net o en su lugar por correo aéreo en disquette de 3.5 pulgadas a: Lic. José Luis Martínez, Editor, Casilla de Correos 70036, Santiago 7, Chile.

Los trabajos se acompañarán de una relación de los correos electrónicos y/o direcciones postales de todos los autores. El autor principal se responsabilizará de la conformidad de cada uno de ellos con su publicación en **BLACPMA**, así como de cualquier problema surgido por la autoría y/o originalidad del trabajo.

Una vez recibidos, los trabajos se enviarán a dos evaluadores que decidirán su aprobación o rechazo.

Los trabajos se dividirán en Introducción, Materiales y Métodos, Resultados, Discusión y Conclusiones y Bibliografía. En cualquiera de las modalidades en la cual se presenten los trabajos, en la primera página deberá aparecer: Título del trabajo (en español e inglés), autores, institución a la cual pertenecen los autores, dirección del autor principal y correo electrónico. Deberá aparecer además un resumen en español e inglés de no más de 100 palabras, un título corto y un máximo de 6 palabras clave. Los números de las tablas y las figuras deben ser arábigos.

Las referencias bibliográficas se numerarán según el orden de mención en el texto y deberán identificarse con número arábigos. Se incluirán citas de documentos relevantes y publicados; los documentos no publicados o citas personales se incluirán dentro del texto entre paréntesis. A continuación algunos ejemplos de los principales casos:

Revistas:

Kostennikova ZA. (1983). UV spectrophotometric quantitative determination of flavonoids in Calendula tincture. *Farmatsiya* 33 (6): 83 – 88

Soto H, Rovirosa J, San Martín A, Argandoña V. (1994). Metabolitos secundarios de *Dictyota crenulata*. *Bol. Soc. Chil. Quím.* 39 (3): 173–178.

Libros

Durand E, Miranda M, Cuellar A. (1986). Manual de prácticas de laboratorio de Farmacognosia. Ed. Pueblo y Educación, La Habana, Cuba. 130 pp.

Capítulos de Libros:

Lopes de Almeida JM. (2000). Formulación farmacéutica de productos fitoterapéuticos, pp 113-124. En Sharapin, N: Fundamentos de tecnología de productos fitoterapéuticos. Ed. CAB y CYTED, Bogotá, Colombia.

Gracias de antemano por sus colaboraciones



The medicinal properties of plants are known since time immemorial from all over the world in general and tropical countries or countries rich in bio-diversity in particular. In countries like Brazil, China and India, the herbal healers are accomplished doctors and great botanists. Ayurvedic (ancient Science of life) and Unani system are well known for the use of herbal medicines. Moreover, in homeopathic system also medicinal herbs are used. With the recent advances in bio-chemical and biotechnological processes, plants have been considered as sources of new therapeutically-active molecules. Some current examples of plant which produce drug include *Ochrosia*, *Rauwolfia serpentina*, *Digitalis*, *Podophyllum peltatum*, *Taxus* and *Artemisia annua*.

The diversity of medicinal flora and plant-based drugs are still to be explored. We still depend on many chemical compounds of plant-origin, such as, atropine (*Atropa belladonna*), colchicines (*Colchicum autumnale*), codeine (*Papaver somniferum*), Digoxin (*Digitalis lanata*), Pilocarpine (*Pilocarpus sp.*), quinine (*Cinchona ledgeriana*), vincristine and vinblastine (*Catharanthus roseus*), Artemisin (*Artemisia annua*) and taxol, etc. The discovery of anticancerous compounds camptothecin, found in the Chinese tree *Camptotheca acuminata* and Taxol, found in the Pacific yew tree *Taxus brevifolia* has revolutionized the pharmaceutical world.

In the recent years, there has been increasing awareness towards use of medicinal plants as allopathic drugs are costly and exhibit various side-effects. Unfortunately, a large number of medicinal plants are at the verge of extinction. It is estimated that nearly 60,000 higher plant species or one in four of the world's total, will be extinct or near extinct by the middle of this century. According to an estimate of threatened plants committee of "International Union for Conservation of Nature and Natural Resources" (IUCN) about 10 per cent (20,000 - 30,000) of the world's flowering plants are reported to be dangerously rare or under threat. If the present trend continues, it is feared that by the year 2020, one third of the species will be lost. The Amazon forest, in northern Brazil, is also threatened by deforestation. Due to industrialization, deforestation, over-grazing, the ever-increasing pressure for agricultural land and non-judicious utilization, the medicinal plants are threatened, vulnerable, endangered or at the verge of extinction. At present 95% plants are collected from the wild. The current methods of harvesting the medicinal plants are not sustainable as a result several plants are at high risk.

The need for conservation of medicinal plants was realized as early as 1978 at the WHO conference at Alma Ata, where it was declared that to achieve health for all by 2000, there was an urgent need for strengthening traditional medical systems and their medicinal plants resource base in the context of Primary Health Care. The urgency of the WHO declarations for tropical countries having rich medicinal flora became all the more apparent when it was realized that medicinal plants are still being used by the rural and tribal communities in countries like Brazil, China and India. WHO, IUCN, WWF also held an International Consultative Meeting at Chiang Mai in Thailand on March 21 to 27, 1988. The result was the Chiang Mai declaration "Saving lives by saving plants" which affirms the importance of medicinal plants and call on the United Nations, its agencies and member states, as well as other international organizations, to take action for the conservation of medicinal plants. In agenda-21 of the United Nations Conference on Environment and Development, and the 1993 international Convention on Biodiversity, it was suggested that a multi-pronged approach should be used by considering the strategies for conservation. The need of the hour is to generate awareness among the local rural and tribal people and involve them for conservation and judicious utilization of medicinal plants. Strategies for conservation and multiplication of medicinal plants should be developed to save the plants by *in situ* and *ex situ* multiplication. Now, it is the proper time to apply modern biotechnological methods for conservation of rare and endangered medicinal plants. The micropropagation is one of the ways for rapid multiplication and conservation of medicinal plants, like *Rauwolfia serpentina*, *Gloriosa superba*, *Podophyllum*, etc. There is a compelling need to establish "The germplasm collection centers" of rare and endangered medicinal plants. The modern techniques, such as "Cryopreservation" will also be useful. Furthermore, gene banks also play important role in conservation of plant genetic resources. Molecular markers and gene sequencing are important tools for gene bank management, particularly because they can be used to estimate genetic relationships within a germplasm collection. Establishing DNA banks are the better alternatives for conservation. The countries rich in biodiversity should come forward for setting up of DNA banks. Finally, we hope that this issue of BLACPMA will be immensely useful to the researchers and may generate new ideas for further research.

Dr. Mahendra Rai

Amravati University
India



Comentario

La columna de Michael Heinrich

A partir de este número el Prof. Michael Heinrich, Director del Centro de Farmacognosia y Fitoterapia de la Universidad de Londres, nos hará llegar sus opiniones y comentarios. Muchos conocerán al Prof. Heinrich por su amor y dedicación al estudio de los pueblos indígenas mexicanos y en general de la cultura latinoamericana.

Agradecemos al Prof Heinrich su generosa disponibilidad.

El Comité Editorial

Las múltiples tareas de la fitoquímica

Hace algunos meses los doctores José María Prieto y José Luis Martínez me invitaron a contribuir regularmente con una columna a este boletín electrónico y ante todo quiero agradecerles la confianza e interés. Me da mucho gusto compartir algunas ideas con Ustedes.

Estoy escribiendo estas líneas en Vancouver, Canadá después del II Congreso Anual de Investigación sobre Productos Naturales para la Salud. British Columbia en el sureste de Canadá es bien conocida por su biodiversidad y sus tradiciones indígenas muy diversas y hoy la ciudad de Vancouver, que obviamente se construyó sobre terreno tradicional indígena es una de las ciudades más modernas y más dinámicas del mundo. Grupos indígenas de la llamada Northwest Coast (Costa del Noroeste del subcontinente). Central para el congreso fue la integración de investigaciones básicas y clínica-aplicadas. Investigadores de universidades y de compañías privadas, representantes de grupos indígenas y miembros de dependencias del gobierno federal participaron en la reunión que así atrajo una diversidad de gente interesadas en plantas medicinales.

Hace algunos años el enfoque de los estudios en el campo de la fitoquímica fué sobre investigaciones fitoquímicas de plantas de vez en cuando ampliados por estudios farmacológicos. Hoy estudios clínicos, investigaciones bioquímicas para establecer el mecanismo de acción pero también la discusión entre los diversos socios intelectuales e interesados son temas centrales de la discusión. Así lo mas bonito de la reunión fue el intercambio multidisciplinario y abierto que traspasó el marco de las ciencias 'exactas' y no un evento estrictamente académico. Así llegamos a la pregunta: ¿Que enfoques tendrán las investigaciones en este campo en el futuro? La investigación de extractos complejos como entidad medica hoy en día es una actividad que está reconocida por más y más investigadores (pero todavía no por las fundaciones de apoyo a la investigación). Como consecuencia las fitomedicinas entran como un tema central al campo de investigaciones de plantas medicinales. Al mismo tiempo investigaciones multidisciplinarias son un elemento central del estudio de plantas medicinales. Lo especial del congreso fueron estudios que integran aspectos socioculturales con la investigación biocientífica de estos recursos. Pero lo que dio un carácter único al congreso fue la

representación de grupos indígenas de Canadá, que presentaron su visión de sus necesidades de una perspectiva espiritual. Obviamente eso no es una idea nueva, y en el campo de la etnobiología había varios congresos con una muy fuerte representación de socios intelectuales y espirituales como médicos tradicionales, pero es una idea que no fue aceptado tanto por muchos investigadores de las 'ciencias exactas'.

¿Cuál es el objetivo de un congreso sobre investigación de 'productos naturales para la salud'? La investigación biocientífica se ha enfocado a cuestiones de algunas disciplinas específicas como la fitoquímica, farmacología, etnobotánica, botánica aplicada o farmacognosia. Obviamente en las últimas décadas colaboraciones más que nada entre farmacólogos y fitoquímicos resultaron en proyectos "bidisciplinarios". Lo especial de esta reunión es una visión sobre los *extractos como medicamentos y la intención de incluir todos los socios intelectuales y espirituales en esta discusión*. Así contribuciones por ejemplo del director del Centro Nacional de Medicina Complementaria y Alternativa de los Institutos Nacionales de Salud (NIH – INS), EEUU dio un panorama de los proyectos financiados por esta institución. Nancy Turner, etnobotánica famosa de la Universidad de Victoria discutió ejemplos del papel espiritual y general de plantas medicinales de los indígenas de esta zona costera. Otros ejemplos fueron presentaciones del Prof. Norman Farnsworth de la Universidad de Illinois (Chicago) y el autor de estas líneas sobre proyectos fitoquímico-farmacológicos. Un día completo se dedicó a estudios clínicos de fitomedicinas y requisitos generales y específicos para este tipo de investigación. El Jefe Fred Sampson de la tribu de los Siska nos dio su versión autóctona de la medicina Siska.

Tomo el ejemplo de este congreso para demostrar la importancia hoy en día de un enfoque multidisciplinario. La investigación de plantas medicinales ya no es solamente el papel de fitoquímicos, sino de una diversidad de expertos y socios intelectuales y espirituales. Asimismo el papel central del fitoquímico en estas investigaciones le da nuevas tareas como por ejemplo la validación de extractos utilizados en estudios clínicos por medio del HPLC o con otros métodos adecuados. Lo extraño del caso es que en países como los EEUU plantas medicinales son una medicina alternativa,

mientras que en muchas regiones de América del Sur, Centro América y México la medicina más importante, más cotidiana y más utilizada es la medicina tradicional y la biomedicina es la alternativa para unos pocos.

¿Que caminos tomamos de acá? Mientras que investigaciones fitoquímicas y farmacológicas de plantas medicinales siguen siendo importantes, necesitaremos más y más estudios clínicos (específicamente estudios controlados) de extractos complejos. Nos falta apoyo para desarrollar la medicina autóctona indígena de América en una forma multidisciplinaria. Los desarrollos en Canadá nos dan un ejemplo como hacerlo, pero todos en Canadá también están muy conscientes que congresos como este indican *el inicio un proceso muy largo*.

Pero quiero terminar con unas líneas sobre la visión indígena del mundo que nos indica en palabras muy bonitas la dependencia del hombre de la naturaleza. Una figura central y muy famosa de la mitología del Noroeste es el 'Raven' (cuervo). Este fue el animal que dió luz al mundo y para eso él tenía que robarla a un viejo que tenía la luz encarcelada en un baúl. Pero el cuervo también es el ser que ayudó a los primeros seres humanos escondidos en una concha gigante. Circulando el cielo después de haber dado luz al mundo y estando solo Raven escucho unos gritos muy débiles, investigó la situación y encontró a los primeros humanos en esta concha gigante que él pudo sacar con su lengua muy delgada. Así los humanos empezaron a difundirse sobre la tierra.

Prof. Michael Heinrich

Centre for Pharmacognosy and Phytotherapy
The School of Pharmacy, University of London,
29-39 Brunswick Sq. London WC1N 1AX, UK
Tel.: 0044-(0)20-7753-5844,
Fax.: 0044-(0)20-7753-5909,
Email: phyto@ulsop.ac.uk



Eventos

**V REUNIÓN DE LA SOCIEDAD LATINOAMERICANA DE FITOQUÍMICA
"PROF. EMER. PATRICK MOYNA" Y
I CONGRESO DE FITOTERÁPICOS DEL MERCOSUR**

28 de Noviembre y el 2 de Diciembre de 2005.

Montevideo (Uruguay)

Información:

<http://solafi5.fq.edu.uy>.

**9TH INTERNATIONAL CONGRESS "PHYTOPHARM 2005"
AND PSE YOUNG SCIENTISTS MEETING ON "PLANTS AND HEALTH"**

The Ministry of Public Health and Social Politic of Russian Federation,
Interregional Center "Adaptogen", (Rusia),

The Phytochemical Society of Europe y

Foundation for Assistance to Small Innovative Enterprises (Rusia)

22 al 25 Junio de 2005

St-Petersburg (Rusia)

Web-site:

<http://www.adaptogen.ru/phyto2005.html>

XIV Congreso Italo-Latinoamericano de Etnomedicina

25 al 29 de Septiembre de 2005

Ciudad de México (México)

web-site: <http://www.facmed.unam.mx/unamsilae/index.html>

EVALUACIÓN DE DOS METODOLOGÍAS PARA DETERMINAR LA ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA DE PLANTAS MEDICINALES

(Evaluation of two methodologies to determine the antimicrobial activity of medicinal plants)

JHON J. ROJAS^{1*}, AURA M. GARCÍA², ALVIN J. LÓPEZ³.

1 Profesor Asociado. Departamento de Farmacia. Facultad de Química Farmacéutica. Universidad de Antioquia. Medellín-Colombia. Apartado Aéreo 1226 Fax. 2105457. E-mail: jrojas@farmacia.udea.edu.co

2 Químico Farmacéutico. Jefe de Farmacia. Clínica Colsubsidio. Bogotá-Colombia.

3 Estudiante de Química Farmacéutica del 9 semestre. Grupo de prácticas Farmacoquímicas.

Recibido 9 de Mayo de 2004; Aceptado 26 de Junio de 2004

Resumen

Se evaluó el método de pozos en agar modificado y el método de Kirby-Bauer para determinar la actividad antimicrobiana de los extractos acetónico, acuoso y etanólico de *Spilantes americana* a cuatro concentraciones (0; 0,08; 5 y 20 mg/ml). Los microorganismos de trabajo fueron *Staphylococcus aureus* (ATCC 29737), *Pseudomona aeruginosa* (ATCC 25619), *Escherichia coli* (ATCC 10536), *Streptococcus β hemolítico* (ATCC 10389), y *Saccharomyces cerevisiae* (ATCC 2601). Los resultados mostraron una fuerte correlación entre los dos métodos (Valor $p < 0,01$). Además, el método de pozos fue mucho más sensible ($\alpha = 0,05$) que el método Kirby-Bauer para determinar actividad antimicrobiana.

Palabras clave: Actividad antimicrobiana, *Spilantes americana*, Kirby-Bauer, Método de pozos modificado

Abstract

The modified agar well method and the Kirby-Bauer method were evaluated to determine the antimicrobial activity of the acetonic, aqueous and ethanolic extracts of *Spilantes Americana*, using four concentrations (0.0; 0.08; 5. y 20 mg/ml). The working microorganisms were *Staphylococcus aureus* (ATCC 29737), *Pseudomona aeruginosa* (ATCC 25619), *Escherichia coli* (ATCC 10536), *Streptococcus β hemolítico* (ATCC 10389), y *Saccharomyces cerevisiae* (ATCC 2601). The results showed a strong correlation between the two methods ($p < 0.01$). Also the agar well method was more sensitive ($\alpha = 0.05$) to determine the antimicrobial activity.

Key Words: Antimicrobial activity, *Spilantes americana*, Kirby-Bauer, agar well modified method.

INTRODUCCIÓN

En la actualidad se cuenta con diversos métodos para evaluar la actividad antimicrobiana de sustancias sintéticas. Estos métodos se aplican mucho en el ámbito hospitalario como el caso del método de difusión de discos (Kirby-Bauer), (1,2) el método de pozos en agar (3) y método de dilución en tubos (turbidimétrico) (4) para hallar no sólo la potencia sino también la resistencia de algunos microorganismos a ciertos antibióticos.

Aunque en teoría cualquiera de los métodos anteriores podría utilizarse para hallar la actividad antimicrobiana de extractos vegetales cada uno posee ciertos inconvenientes, razón por la cual en el momento de realizar las pruebas se deben hacer modificaciones para que estas metodologías sean adecuadas, reproducibles y fiables (5).

En este trabajo hemos comparado los halos de inhibición producidos por el método de Kirby-Bauer con respecto al método de pozos en agar para determinar la actividad antimicrobiana de los extractos acuosos, acetónico y etanólico de *Spilantes americana*, controlando los siguientes factores (6):

- Concentración del microorganismo en la superficie del agar (10^8 cel/ml o 0.5 unidades en el patrón de Mc. Farland).
- Profundidad del medio en la placa (0.6 mm).
- El pH del medio (7.2 +/- 0.2).
- Atmósfera de incubación (condiciones aeróbicas).
- Medio de crecimiento (agar Mueller-Hinton para el método Kirby-Bauer y medios selectivos para el método de pozuelos).
- Temperatura de incubación de 35 +/- 2°C para bacterias y de 29 +/- 2°C para *Saccharomyces cerevisiae*.

MATERIALES Y MÉTODOS

Material vegetal. Para realizar el estudio se escogió la *Spilanthes americana* (Mutis), ya que esta es muy utilizada en medicina popular en las zonas frías de Colombia para tratar las aftas bucales y algunos tipos de herpes. La planta se recolectó en su hábitat natural (Municipio de Guarne, a 2150 msnm) y luego se identificó en el herbario de la Universidad de Antioquia.

Preparación de los extractos. Se recolectaron 800 gramos de las partes aéreas (hojas, tallos y flores) de la planta *Spilantes americana* y se sometieron a secado a 50° C por 24 horas. Luego el material se pulverizó en un molino de cuchillas y se prepararon los extractos acetónico y etanólico por maceración de 50 g del material por 72 horas a temperatura ambiente. Posteriormente, el material macerado se sometió a agitación constante por media hora a 120 rpm. El extracto acuoso se obtuvo sometiendo 50 g del material vegetal seco en agua destilada a ebullición y agitación constante por media hora. Finalmente las soluciones se filtraron y se concentraron a sequedad en un rotaevaporador y los residuos se redisolviéron en su propio disolvente para obtener soluciones stock de concentración exactamente conocida. Los disolventes utilizados (acetona y etanol) fueron marca Merck del 99.5% de pureza (7).

Microorganismos utilizados. Los microorganismos para la prueba fueron 2 bacterias gram positivas: *Staphylococcus aureus* (ATCC 29737), *Streptococcus β hemolitico* (ATCC 10389), 2 gram negativas: *Pseudomona aeruginosa* (ATCC 25619), *Escherichia coli* (ATCC 10536) y una levadura: *Saccharomyces cerevisiae* (ATCC 2601).

Fármacos de referencia. Se utilizaron Gentamicina, Clindamicina y Nistatina como controles positivos de actividad antimicrobiana.

Medios de cultivo. Las cepas liofilizadas se replicaron en tubos de agar inclinado con agar Nutritivo (bacterias) y agar Saboraud-Dextrosa (levadura) y se incubaron por 24 horas a 35 ± 2° C excepto la levadura que se incubó a 29 ± 2° C por 48 horas. Para las pruebas de

actividad antimicrobiana, las células se dejaron incubando según el método de pozos en agar modificado en: a. Baird-Parker (*Staphylococcus aureus*), a. Cetrimide (*Pseudomona aeruginosa*), a. Mc conkey (*Escherichia coli*), a. Sangre (*Streptococcus β hemolitico*), a. Saboraud-dextrosa (*Saccharomyces cerevisiae*) y según el método Kirby-Bauer en agar Mueller-Hinton excepto *Saccharomyces cerevisiae* (a. Saboraud-Dextrosa). Todos los medios se prepararon y trataron según las instrucciones del fabricante (Becton Dickinson. MD. USA) (8).

Preparación del inóculo. Se sometió a incubación cada una de las cepas en tubos de agar inclinado con solución salina 0.9% y se incubó a 35 ± 2° C por 24 horas. Luego, la turbidez del medio se fijó en 0.5 unidades (10⁸ cel/mL) según el patrón de Mc Farland y se verificó su absorbancia a 580 nm cercana al 25%. (9).

Método Kirby-Bauer. Se realizó el frotis sobre cada una de la superficie de los agares Mueller-Hinton (bacterias) y Saboreaud-Dextrosa (levadura). Luego se vertieron 25 µL de cada uno de los extractos, estándares y blancos en cada uno de los discos de papel filtro (Whatman No. 42) por triplicado y se colocaron sobre las superficies de cada agar. Las placas se incubaron invertidas a 35 ± 2° C por 18 horas (bacterias) y a 29 ± 2° C por 48 horas (levadura). Posteriormente, se midieron los halos de inhibición incluyendo el diámetro de los discos (10, 11).

Método modificado de pozos de agar. Se hizo el frotis del inóculo sobre cada una de las superficies de los agares selectivos estipulados para éste método. Posteriormente, se hicieron los pozos sobre la superficie de los agares con ayuda de un sacabocados estéril de 6 mm de diámetro, y en cada uno de ellos se vertieron 25 µL de cada uno de los extractos, estándares y blancos por triplicado. Se dejó reposar por 30 minutos. Posteriormente, se incubaron y leyeron las placas de igual forma que el método Kirby-Bauer. (12, 13).

Tabla 1. Halos de inhibición medios producidos por los controles positivos en los dos métodos.

Control Positivo	Media de halos de inhibición (mm) M1			Media de halos de inhibición (mm) M2			Conc. (mg/mL)	Cepa
	1.25 µg	10 µg	80 µg	1.25 µg	10 µg	80 µg		
<i>Gentamicina</i>	0	20	29	0	25	32	1.25	<i>S. aureus</i>
	12	16	21	12	19	28	1.25	<i>P. aeruginosa</i>
	6	8	25	6	11	29	1.25	<i>E. coli</i>
<i>Clindamicina</i>	7	12	25	9	18	32	0.3	<i>S. β hemolítico</i>
<i>Nistatina</i>	0	7	21	0	9	27	0.5	<i>S. cerevisiae</i>

M1: Método de Kirby-Bauer; **M2:** Método modificado de pozos en agar

RESULTADOS

En todos los casos, los disolventes no mostraron efecto inhibitorio. Los controles positivos mostraron, a la concentración más alta, (3,2 mg/mL) halos de inhibición de 21 - 29 mm para el método Kirby-Bauer y de 27 - 32 mm para el método modificado de pozos en agar (tabla 1).

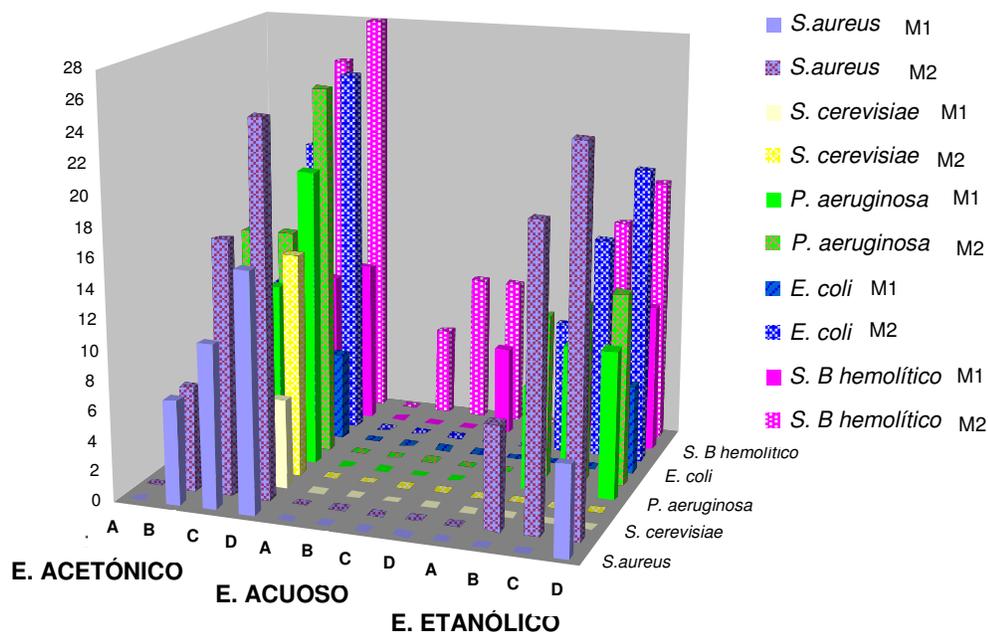
Entre los tres extractos analizados, el extracto acetónico mostró mayor actividad, seguido del etanólico y por último del acuoso, en los dos métodos (figura 1).

La mayor sensibilidad se observó en microorganismos gram-positivos (*S. β hemolítico* y *S. aureus*) expuestos a la fracción acetónica (diámetros de inhibición de 7 - 28 mm).

Además, el microorganismo más sensible en el extracto etanólico fue el *S. aureus* (diámetros de inhibición de 7 a 25 mm), mostrando una mayor respuesta al utilizarse el método modificado de pozos en agar. Por el contrario, el extracto acuoso mostró actividad nula en todos los microorganismos, excepto en *S. β hemolítico* en el cual mostró actividad muy leve (diámetros de inhibición de 6 - 10 mm).

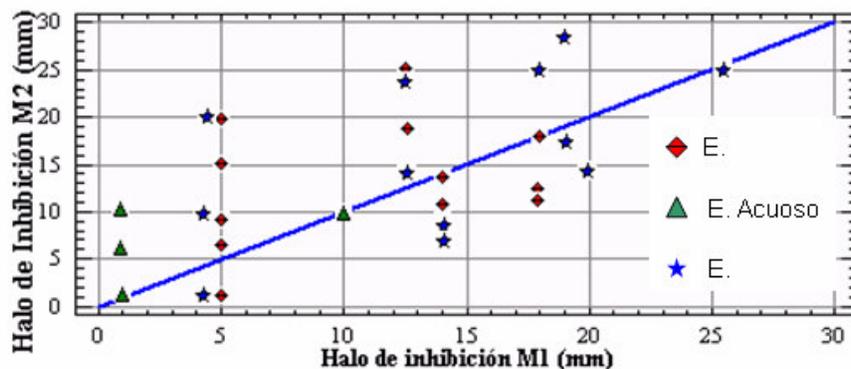
Los diámetros de inhibición al aplicar el método Kirby-Bauer fueron ligeramente menores a los del método modificado de pozos en agar para los subgrupos *S. aureus*, *S. β hemolítico*, *E. coli* y *S. cerevisiae* (extractos acetónicos y etanólicos) y *S. β hemolítico* (extracto acuoso).

Figura 1. Halos de inhibición (mm) producidos por cada subgrupo (microorganismo-extracto) en cada método.



A: 0.0 mg/ml (solvente), **B:** 0.08 mg/ml, **C:** 5 mg/ml, **D:** 20 mg/ml;

M1: Método Kirby-Bauer, **M2:** Método modificado de pozos en agar.

Figura 2. Correlación entre los halos de inhibición (mm) producidos por los métodos.

M1: Método Kirby-Bauer. M2: Método modificado de pozos en agar.

DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES

Se aplicó la prueba de Kurtosis y sesgamiento estándar a cada uno de los subgrupos (extracto-microorganismo) y todos los valores de estas pruebas estadísticas dieron dentro del rango -2 a $+2$, lo que indica que no existe ninguna desviación significativa de la normalidad entre los diámetros de inhibición de los dos métodos (14).

Posteriormente, se realizaron pruebas F para comparar las varianzas de los halos de inhibición entre los dos métodos. Como el intervalo de confianza para la razón de varianzas contiene el valor de 1, se deduce que no existen diferencias estadísticamente significativas entre las desviaciones estándares de los dos métodos para cada subgrupo con un nivel de confianza del 95%. Finalmente, se realizaron análisis de correlación lineal entre los diámetros de inhibición de cada método para los extractos acetónicos, etanólicos y acuosos a cuatro concentraciones (0.00, 0.08, 5.00 y 20 mg/mL).

Como en los análisis de varianza el valor p en la tabla ANOVA fue menor de 0.01, y además los coeficientes de correlación (r) obtenidos fueron

superiores al valor límite (0.561), existe una relación estadísticamente significativa entre los halos de inhibición de los métodos Kirby-Bauer (M1) y modificado de pozos en agar (M2) para todos los extractos, con un nivel de confianza del 99%. (tabla 2).

Al comparar las medias de dos métodos (M1: Kirby-Bauer y M2: modificado de pozos en agar) para cada subgrupo (extracto-microorganismo) se observa que el valor p de la prueba es mayor que t, por lo se rechaza H_0 (media del halo de inhibición M1 = media del halo de inhibición del M2) (tabla 3). Como consecuencia, se concluye que existe una diferencia significativa entre los halos de inhibición de cada método, siendo la media de los halos de inhibición del método modificado de pozos en agar superior a los del método Kirby-Bauer, con una confianza del 95% (15). Esto quiere decir que el método de pozos en agar fue más sensible que el método Kirby-Bauer para determinar la actividad antimicrobiana de la *Spilantes americana*. Por lo tanto parece recomendable utilizar el método modificado de pozos en agar para realizar ensayos de actividad antimicrobiana en plantas medicinales bajo las condiciones estandarizadas en este estudio.

Tabla 2. Análisis de varianza de las regresiones para cada uno de los extractos.

Extracto	Fuente de variación	Suma de cuadrados	G.L.	Media de cuadrados	Razón F	Valor P
Acetónico	Modelo	1243.66	1	1243.66	26.50	0.0001
	Residual	844.89	18	46.94		
	Total (Corr.)	2088.55	19	-		
Etanólico	Modelo	511.88	1	511.88	11.22	0.0036
	Residual	820.92	18	45.61		
	Total (Corr.)	1332.80	19	-		
Acuoso	Modelo	79.67	1	79.67	11.70	0.0030
	Residual	122.53	18	6.81		
	Total (Corr.)	202.20	19	-		

Tabla 3. Pruebas estadísticas de comparación de las medias de los halos de inhibición entre los dos métodos.

Subgrupo	M1 ($\mu_1 \pm DS$)	M2 ($\mu_2 \pm DS$)	Δ medias ($\mu_1 - \mu_2$)	Valor tabla (t)	Valor p
E. acetónico / <i>S. aureus</i>	8.5 \pm 10.8	12.3 \pm 17.5	-3.8 \pm 15.8	-0.5811	0.5823
E. acetónico / <i>S. β hemolítico</i>	7.0 \pm 7.9	15.8 \pm 20.9	-8.8 \pm 17.2	-1.2471	0.2588
E. acetónico / <i>P. aeruginosa</i>	9.5 \pm 13.6	13.8 \pm 16.4	-4.3 \pm 16.4	-0.6349	0.5489
E. acetónico / <i>E. coli</i>	1.5 \pm 4.8	13.8 \pm 17.6	-12.3 \pm 14.1	-2.1331	0.0769
E. acetónico / <i>S. cerevisiae</i>	1.5 \pm 4.8	3.8 \pm 11.9	-2.3 \pm 9.9	-0.5571	0.5976
E. etanólico / <i>S. aureus</i>	1.5 \pm 4.8	13.0 \pm 18.3	-11.5 \pm 14.6	-1.9324	0.1015
E. etanólico <i>P. aeruginosa</i>	4.3 \pm 8.0	10.0 \pm 12.9	-5.8 \pm 11.7	-1.2017	0.2748
E. etanólico / <i>E. coli</i>	6.8 \pm 7.5	9.0 \pm 9.6	-2.3 \pm 9.4	-0.5863	0.5791
E. acuoso / <i>S. β hemolítico</i>	1.5 \pm 4.8	6.5 \pm 7.5	-5.0 \pm 6.8	-1.7865	0.1243

μ : Media de los halos de inhibición del subgrupo (mm); **M1**: Método Kirby-Bauer; **M2**: Método modificado de pozos en agar; **DS**: desviación estándar.

BIBLIOGRAFÍA

- (1) Phillips, I (1998). The subtleties of antibiotic resistance. J. Antimic. Chemother. 42: 5 - 12.
- (2) Wayne PA (1997). Performance Standards for Antimicrobial Disk Susceptibility Tests National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS) Approved Standard M2-A6. En <http://www.nccls.org/es/source/orders/free/m2-a8.pdf>
- (3) Frobisher M, Hinsdill RD, Krabtree KT (1974). Fundamentals of Microbiology, Ed. W.B. Saunders Company, Philadelphia, EEUU, 390 pp.
- (4) Wilcke J. (1999). Antimicrobial therapy. Virginia-Maryland Regional College of Veterinary and Medicine. En <http://cpharm.vetmed.vt.edu/vm8784/ANTIMICROBIALS/Principles.htm>
- (5) Escobar A (2002). Prueba de susceptibilidad antimicrobiana por difusión en agar. En http://www.ispch.cl/lab_sal/doc/man_sucep.pdf
- (6) Ospina L, Olarte J, Nuñez E (1985). Estudio fitofarmacológico de la fracción liposoluble de las flores de la *Spilanthes americana* (mutis) parte I: estudio fitoquímico. Revista Colombiana de Ciencias Químico Farmacéuticas. 4: 37 - 45.
- (7) Buzzini P, Martini A (2001). Discrimination between *Candida albicans* and Other Pathogenic Species of the Genus *Candida* by Their Differential Sensitivities to Toxins of a Panel of Killer Yeasts. J. Clin. Microbiol. 39: 3362 - 3364
- (8) Gerson S, Green LH (2000). Preliminary Evaluation of the Antifungal Activity of Extracts of *Morinda citrifolia* Linn. Lett. Appl. Microbiol. 30: 379 - 380
- (9) Martinez MJ, Badell JB, González NA. (1996). Ausencia de actividad antimicrobiana de un extracto acuoso liofilizado de *Aloe vera* (sabila). Rev. Cubana Plant. Med. 1: 18 - 20
- (10) Mahasneh AM, El-Oqlah AA. (1999). Antimicrobial activity of extracts of herbal plants used in the traditional medicine of Jordan. J. Ethnopharm. 64(3):271-276.
- (11) Rossi C, Arias G, Lozano N (2002). Evaluación antimicrobiana y fitoquímica de *Lepechinia meyeri* Walp "Salvia". Ciencia e Investigación 5: 1 - 6.
- (12) Buzzini P, Pieroni A (2003). Antimicrobial activity of extracts of *Clematis vitalba* towards pathogenic yeast and yeast-like microorganisms. Fitoterapia 74: 397 - 400.
- (13) Morais LAS, Do Carmo MGF, Viegas ECDF et al. (2000). Evaluation of antimicrobial activity of extracts of medicinal plants on three tomato phytopathogens. ISHR Acta Horticulturae 569. En <http://actahort.org/books/569/index/htm>
- (14) Chow SC (2002). Statistic in drug research. Ed. Marcel Dekker Inc, New York, EEUU. 570 pp.
- (15) Bolton A. (1997) Pharmaceutical statistics. Practical and clinical applications. Ed. Marcel Dekker Inc. New York, EEUU. 360 pp.

Este artículo puede ser libremente distribuido y/o copiado para uso personal siempre que lo sea en su integridad. No se permite su modificación ni su uso parcial o total para fines comerciales. Si por cualquier razón Vd. desea redistribuirlo en gran cantidad le agradeceremos que nos lo informe. Todo trabajo basado en este artículo o derivado de su uso debe citar convenientemente la fuente.



<http://www.blacpma.cl>



Chile

ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE DE INFUSOS DE *UGNI MOLINAE* TURCZ (“MURTILLA”).

(Antioxidant activity of *Ugni molinae* Turcz “Murtilla” infuses)

MARCIA AVELLO, EDGAR PASTENE

Departamento de Farmacia, Facultad de Farmacia, Universidad de Concepción.

Correspondencia a: Prof. Marcia Avello Lorca Fax: (041)-207086; Casilla 237, Concepción-Chile

e-mail: maavello@udec.cl

Recibido 15 de Julio de 2004; Aceptado 4 de Septiembre de 2004

RESUMEN

Existen evidencias epidemiológicas que sustentan el papel patogénico de los radicales libres en procesos biológicos, los que pueden disminuir al aumentar la ingesta de antioxidantes. Estudios preliminares realizados en hojas de la planta chilena *Ugni molinae* Turcz. (“Murtilla”), mostraron la presencia de elevadas concentraciones de compuestos polifenólicos con capacidad antioxidante *in vitro*. El objetivo de este trabajo fue evaluar el efecto de *Ugni molinae* en el estatus antioxidante plasmático de voluntarios sanos después de la ingesta del infuso (1 %) durante un periodo de tres días. Para esto, se utilizó el método de Capacidad de Absorción de Radicales Oxígeno (ORAC) en muestras de sangre obtenidas al comienzo y al final del estudio. La determinación de los valores ORAC en los voluntarios, permitió detectar cambios significativos en relación con sus niveles basales de antioxidantes plasmáticos hidrofílicos. Este incremento en la capacidad antioxidante expresada como ORAC plasmático (μM Trolox equiv/l) fue de un 27,3 % en relación con los niveles basales. El valor ORAC para el infuso (1 %) correspondió a 533,11 μM equivalentes Trolox®/g de hojas secas. En este estudio se demostró la capacidad antioxidante del infuso (1 %) de hojas de *Ugni molinae* y el incremento en la capacidad antioxidante plasmática asociada a su ingesta regular.

Palabras clave: *Ugni molinae*, capacidad antioxidante, plasma humano.

ABSTRACT

Free radicals have been implicated in the development of pathologic process. Increasing the serum antioxidant status has been proposed as a preventive means to reduce the development of these diseases. Preliminary studies in the leaves of *Ugni molinae* Turcz. (“Murtilla”) showed high levels of polyphenols compounds with antioxidant capacity *in vitro*. The purpose of this study was to evaluate the effect of *Ugni molinae* on the serum antioxidant status as measured in healthy human subjects, after the intake of 1 % infusion during three days. The Oxygen Radical Absorption Capacity (ORAC) was applied to blood samples obtained at the beginning and at the end of the study. Determination of ORAC values in the volunteers allow detects significant changes related to its basal levels of hydrophilic plasmatic antioxidants. This increasing of the plasmatic antioxidant capacity expressed as plasmatic ORAC (μM Trolox equiv/l) was around 27.3 % related to basal levels. The ORAC value for the 1% infuses was 533.11 μM equivalents Trolox®/g of dried leaves. In this study the antioxidant capacity of 1% infuse of *Ugni molinae* leaves and the increased serum antioxidant capacity associated to its intake was demonstrated.

Key Words: *Ugni molinae*, antioxidant capacity, human plasma.

INTRODUCCIÓN

Existen evidencias epidemiológicas que sustentan el papel patogénico de los radicales libres en procesos biológicos (1). Los principales antecedentes surgen de estudios que muestran la correlación entre la incidencia de enfermedades inflamatorias y degenerativas y las bajas concentraciones de antioxidantes en sangre (2). La relación entre la presencia de algunas enfermedades, como las

cardiovasculares y cáncer entre otras, se puede establecer con la elevación de marcadores de daño oxidativo y disminución de los niveles plasmáticos de antioxidantes, los que pueden ser modificados al aumentar la ingesta de antioxidantes (3,4). En el organismo existe una variedad de defensas antioxidantes las que incluyen antioxidantes endógenos y exógenos provenientes de la dieta como las vitaminas E y C, carotenoides y polifenoles (5). Cuando éstas son sobrepasadas, se produce daño oxidativo

en lípidos, proteínas, carbohidratos y ácidos nucleicos (6). Al respecto, el plasma puede estabilizar especies reactivas del oxígeno de vida media mayor, como el anión superóxido o el peróxido de hidrógeno, previniendo reacciones con iones metálicos catalíticos que pueden generar especies aún más nocivas (7). Debido a esto, el estatus antioxidante del plasma es el resultado concomitante de muchos compuestos e interacciones metabólicas sistémicas. La medición de esta capacidad antioxidante combinada, puede ser más relevante que la determinación individual de los antioxidantes presentes en la sangre. A lo anterior, se suma el hecho que la capacidad antioxidante celular esta principalmente determinada por sistemas enzimáticos mientras que, la plasmática está asociada a la concentración de antioxidantes de bajo peso molecular suplementados por la dieta. Estos compuestos son rápidamente consumidos y necesitan ser recambiados para mantener el balance frente a las especies oxidantes.

Los compuestos de naturaleza polifenólica, han demostrado ser eficaces antioxidantes y su estudio tiene singular importancia en sistemas biológicos sometidos a estrés oxidativo, especialmente en membranas biológicas, por su capacidad de inhibir la peroxidación lipídica (8).

Ugni molinae Turcz. es una planta nativa perteneciente a la familia de las *Mirtáceas* conocida tradicionalmente como "Murtilla", "Murta" o "Uñi". Es un arbusto de gran follaje que se distribuye ampliamente entre las provincias de Concepción, Valdivia y Chiloé, donde se utilizan los frutos en la preparación de mermeladas y licores. El empleo medicinal de la planta es de origen indígena y está basado en las propiedades aromáticas y astringentes de las hojas. Los pueblos Mapuches, Puelches y Pehuenches utilizan infusiones de las hojas en el tratamiento de diarreas y disenterías. Los frutos, conocidos por los Mapuches como "Uvas del Bosque", son comestibles y se les atribuye propiedades beneficiosas, mejorando la visión nocturna (9). La información recopilada de la tradición coincide con los resultados obtenidos de los estudios fitoquímicos preliminares, puesto que compuestos polifenólicos como los taninos y flavonoides poseen actividad astringente y potencialmente antioxidante. Estos estudios, realizados en los infusos de la planta, específicamente mostraron la presencia de compuestos polifenólicos como taninos hidrolizables, ácidos fenólicos, flavan-3-oles y flavonoides, con una equivalencia de 400 nM de ácido gálico (EAG). Tanto el infuso como extractos preparados con mezclas

hidroalcohólicas mostraron actividad antioxidante en sistemas *in vitro*. Estos ensayos consideraron técnicas como la estabilización del radical libre estable, 1,1-difenil-2-picrilhidrazilo (DPPH) para el cual la concentración efectiva 50 (EC₅₀) del extracto metanólico liofilizado de *U. molinae* fue de 21 µM EAG. En un modelo de protección frente a la autooxidación de moléculas poliinsaturadas (sistema de liposomas β-caroteno/ácido linoleico), se observó un 95,4% de inhibición. Al estudiar la protección sobre la modificación oxidativa de lipoproteínas de baja densidad (LDL) por iones Cu⁺² durante 24 horas, se observó un 52% de disminución en la formación de dienos conjugados (lipoperoxidación) y 65% en la emisión de fluorescencia (oxidación de proteínas)(10).

El objetivo del presente trabajo fue estudiar el efecto antioxidante del infuso (1%) de las hojas de *U. molinae*, como primer paso en la validación de los usos populares de la especie. Para ello se investigó su efecto en el estatus antioxidante plasmático de voluntarios sanos sometidos a la ingesta de éste, de acuerdo a recomendaciones de su uso tradicional. Para la evaluación *in vivo*, se utilizó el método de Capacidad de Absorción de Radicales Oxígeno (ORAC) que determina en forma directa la capacidad antioxidante hidrofílica frente a una fuente radicalaria (11). ORAC es una metodología basada en los estudios de Glazer (12), quien utilizó la proteína fluorescente *R*-ficoeritrina como sustrato oxidable y 2,2'-azobis(2-amidinopropano) (AAPH) como generador de radicales peroxilo o el sistema Cu²⁺ - H₂O₂ como generador de radical hidroxilo. Este es el único método que registra la acción de la especie radicalaria hasta el final y usa el área bajo la curva (ABC) de decaimiento de fluorescencia para realizar la cuantificación de la capacidad antioxidante. De esta manera, la técnica considera tanto el porcentaje de inhibición como la extensión del tiempo de ésta en un solo valor. Otros modelos recientes que cumplen con estas características son el de la Capacidad total de atrapamiento de oxi-radicales (TOSC), y la cinética de oxidación de crocina (13, 14).

ORAC ha sido empleado en el análisis de sustancias puras, mezclas de antioxidantes naturales, además de tejidos y fluidos biológicos (15-17). En experiencias hechas con voluntarios se observó un aumento significativo de los valores de ORAC plasmáticos posterior a la ingesta de frutas y verduras (18). A diferencia de otros modelos en los cuales se usan agentes oxidantes que no son pro-oxidantes, el ensayo

ORAC puede realizarse con diferentes especies reactivas del oxígeno. Comparaciones entre ORAC y otros métodos para la determinación de capacidad antioxidante plasmática como el *Ferric Reducing Ability of Plasma* (FRAP) o el *Trolox Equivalent Antioxidant Capacity* (TEAC), han demostrado sus ventajas en términos de ser un ensayo más versátil (mide todo tipo de antioxidantes) y con posibilidad de detectar el efecto de antioxidantes a nivel fisiológico. No obstante las ventajas de ORAC, se debe precisar que aun se esta lejos de tener un modelo ideal para la investigación de antioxidantes *in vivo* y es conveniente cotejar resultados con modelos complementarios.

MATERIALES Y MÉTODOS

Material vegetal. Las hojas de *Ugni molinae* Turcz. (*Mirtaceae*) fueron colectadas en Cerro Alto, Concepción, Chile (septiembre, 1998) e identificadas por el Dr. Max Quezada, Departamento de Botánica de la Universidad de Concepción. Una muestra fue depositada en el Herbario bajo el número de CONC 146511.

Obtención del plasma. Se obtuvo sangre por venopunción de siete voluntarios normolipémicos y no diabéticos antes y después de la ingesta de infuso (1%) de hojas de *U. molinae*. Se utilizó EDTA (2,7 mM) como anticoagulante. El plasma fue separado por centrifugación a 800 x g a 4 °C durante 15 min (19). La administración del infuso se llevó a cabo 2 veces al día durante 3 días, basándose en la forma de administración utilizada en medicina popular.

Capacidad de absorción de radicales oxígeno (ORAC). Se preparó una mezcla que contenía 1,7 ml de tampón fosfato 7 mM (pH 7,0), 100 µl de *R*-ficoeritrina (Sigma), 3,4 mg/l, 100 µl de 320 mM 2,2'-azobis-(2-aminopropano) (AAPH) (Aldrich), y 100 µl de plasma diluido. El tampón fosfato fue utilizado como blanco y 1 µM Trolox (Aldrich), análogo soluble de la vitamina E, como estándar. La *R*-ficoeritrina, el tampón fosfato y las muestras fueron incubados a 37 °C durante 15 min. La reacción comenzó con la adición de AAPH. La fluorescencia fue medida y registrada cada dos minutos a una longitud de onda de emisión de 570 nm y 540 nm de excitación utilizando un espectrofluorímetro Shimadzu RF-5301 PC hasta que la fluorescencia alcanzó menos del 5 % de la primera lectura (~70 min). Los resultados se expresaron como capacidad antioxidante plasmática usando las diferencias de las áreas normalizadas bajo las curvas de

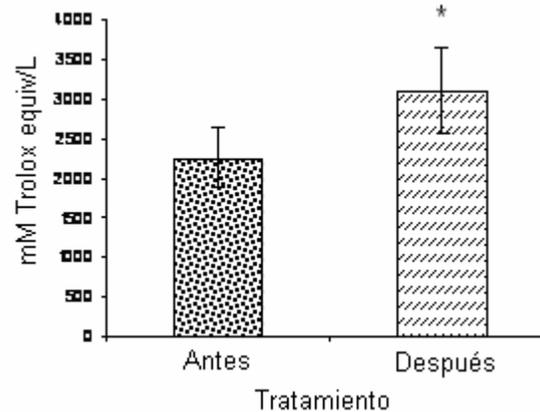
decaimiento de la fluorescencia de *R*-ficoeritrina entre el blanco y la muestra el bajo la curva de fluorescencia. Se determinó el valor ORAC del infuso expresándolo como µM de Equivalentes de Trolox (Trolox equiv) por gramo de hojas secas de *U. molinae* (20).

Ácido úrico y proteínas totales en plasma. Se realizó con reactivos (uricasa/peroxidasa y Biuret, respectivamente) y según el manual de Procedimientos Biosystems.

RESULTADOS

En las muestras plasmáticas antes y después de la ingesta de infuso (1 %) de hojas de *U. molinae* se observa diferencia significativa (*t*-test, $P < 0,05$) en la capacidad antioxidante. Al comparar las áreas corregidas bajo la curva (ABC) de decaimiento de fluorescencia, se observa un aumento en 850 unidades de área después de la ingesta del infuso. Realizando el cálculo del valor ORAC para el plasma de los voluntarios, se observa un nivel basal de 2258 ± 387 µM Trolox equiv/L, el cual aumenta a 3108 ± 532 µM Trolox equiv/l después del tratamiento continuo con los infusos al 1% (Figura 1).

Figura 1. Capacidad de absorción de radicales del oxígeno (ORAC) plasmática antes y después de la ingesta de infuso (1%) de hojas de *Ugni molinae*.



* $P < 0.05$ vs valores del blanco (tampón fosfato) y valores de las muestras antes de la ingesta de infuso. Los datos son promedio \pm SD (n=7).

Este incremento corresponde a 27,3 %. Los niveles plasmáticos de ácido úrico y proteínas totales se mantienen antes y después de la ingesta de infuso dentro de los niveles normales descritos para hombres y mujeres (ácido úrico: 3,5-7,2 mg/dl, 2,6-6,0 mg/dl respectivamente) y para estado ambulatorio y recostado (proteínas

Tabla 1. Contenido de ácido úrico y proteínas plasmáticas totales en plasma de voluntarios sometidos a ingesta de infuso 1% de hojas de *Ugni molinae*.

Muestras Plasmáticas	Ácido úrico (mg/ dl)		Proteínas totales (g/l)	
	Antes	Después	Antes	Después
1 _f	2,80 ± 0,08	2,90 ± 0,07	85,00 ± 0,01	78,00 ± 0,01
2 _f	2,70 ± 0,06	2,60 ± 0,07	67,00 ± 0,07	70,00 ± 0,00
3 _f	2,80 ± 0,00	2,90 ± 0,07	50,00 ± 0,01	68,00 ± 0,00
4 _m	4,00 ± 0,07	3,90 ± 0,07	75,00 ± 0,02	76,00 ± 0,01
5 _f	4,60 ± 0,07	3,50 ± 0,07	74,00 ± 0,00	80,00 ± 0,01
6 _m	5,40 ± 0,00	5,50 ± 0,00	83,00 ± 0,00	80,00 ± 0,01
7 _m	4,20 ± 0,00	4,20 ± 0,08	64,00 ± 0,01	80,00 ± 0,00

_f sexo femenino, _m sexo masculino. Los datos son promedio ± SD (n=3).

totales: 64 - 83 g/l, 60 - 78 g/l, respectivamente). El análisis estadístico de los datos no mostró diferencias estadísticamente significativas (t-test, $\alpha = 0,05$) (Tabla 1). Al someter el infuso (1 %) a ORAC se observa actividad antioxidante superior al estándar de Trolox 1 μ M, alcanzando a los 60 min de reacción la mínima fluorescencia. El valor ORAC calculado para infuso (1%) de hojas de *U. molinae* integrando el ABC, corresponde a 533,11 μ M de Trolox Equiv /g de hojas secas (Figura 2).

DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES

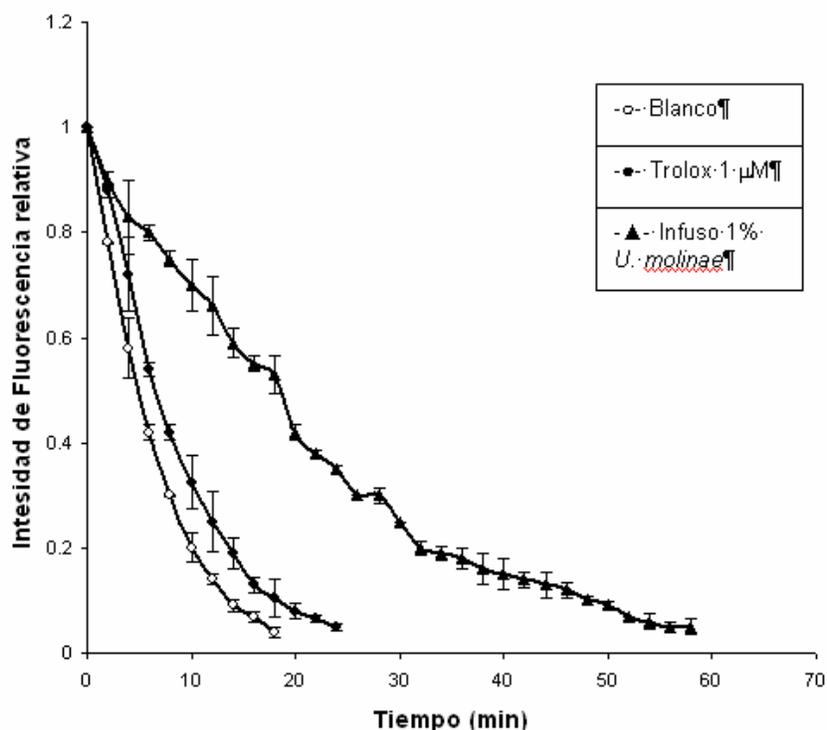
Los radicales libres, especies sumamente reactivas, provocan reacciones en cadena, pudiendo causar daño oxidativo en macromoléculas biológicas. Éstos se generan durante la respiración celular, dando origen a radicales como el hidroxilo (OH[·]) y superóxido (O[·]), entre otros (2). Las sustancias antioxidantes son la principal defensa orgánica frente a estas especies radicalarias. Son de tipo enzimático como la superóxido dismutasa, catalasa, glutatión peroxidasa, y de tipo no enzimático, vitamina E, C, β -caroteno, bilirrubina, glutatión y de origen externo consumidos en la dieta o bien como suplemento. Estas últimas son capaces de reaccionar fácilmente con los radicales y/o especies oxidantes tras lo cual ambos quedan inactivados (21). Para conocer el nivel de antioxidantes circulantes es necesario contar con una batería de métodos que permitan determinar la capacidad antioxidante por atrapamiento de radicales (22, 23). La gran mayoría de estos métodos determina antioxidantes que son hidrosolubles. Entre estos destaca ORAC que permite medir tanto el tiempo como el porcentaje de daño causado por el radical libre (AAPH[·]) a una proteína fluorescente (*R*-ficoeritrina), que manifiesta su integridad en intensidad de

fluorescencia (24). Por lo tanto, el cambio en la intensidad de fluorescencia es un índice del grado de daño inducido por el azo-radical. En la presencia de un antioxidante el daño causado por el radical se retarda en el tiempo, lo que se refleja en la protección contra el cambio de intensidad de fluorescencia con un aumento del ABC.

Los niveles basales observados por el ORAC correspondiente a la condición antes de la ingesta del infuso 1%, manifiestan la participación de antioxidantes endógenos como el ácido úrico, que ha sido descrito como uno de los principales interferentes en este ensayo y en menor cuantía las proteínas plasmáticas (25). Por lo tanto, es indispensable medirlos en las muestras plasmáticas en las que se asocia la ingesta del infuso con un incremento de la capacidad antioxidante plasmática. Los resultados observados evidencian actividad antioxidante, con niveles normales de ácido úrico y proteínas plasmáticas.

La actividad antioxidante del infuso se asocia a su composición fenólica (19, 26). Entre los mecanismos de acción antioxidante de estos compuestos cuentan la donación de protones, atrapamiento de radicales libres y efecto quelante de trazas de metales de transición (27). De esta manera el radical peroxilo representado por AAPH[·] es estabilizado por donación de protones, mientras que los productos de oxidación formados en el daño a la proteína son atrapados por los polifenoles. Este resultado afirma los obtenidos en experimentos previos como la estabilización del radical DPPH por donación de protones y la protección de

Figura 2. Intensidad de fluorescencia relativa a los 60 minutos del infuso (1 %) de hojas de *Ugni molinae*. Los datos son promedio \pm SD (n = 3).



moléculas poliinsaturadas sometidas a oxidación por calor y luz ultravioleta. Estos mecanismos se observan, también, en la protección sobre la oxidación de LDL por iones Cu^{+2} . El efecto quelante de trazas de metales de transición se estudió con iones Cu^{+2} y Fe^{+3} , especies que generalmente catalizan procesos oxidativos biológicos, entre ellos la peroxidación lipídica.

Cao y cols. estudiaron el incremento de la actividad antioxidante plasmática después de la ingesta de vino tinto (300 ml) y vitamina C (1250 mg), mediante el método ORAC, observando un 7 - 25 % de incremento en el ABC con respecto al control (27). En el presente estudio el incremento en el ORAC plasmático con respecto al basal fue de 27,3 %. La magnitud de la respuesta observada no se puede interpretar arbitrariamente como una disminución en el riesgo de enfermedad degenerativa crónica, sólo evidencia incremento en la capacidad antioxidante asociada a la ingesta del infuso en las condiciones de este experimento. Aunque los valores correspondientes a proteínas totales y de ácido úrico plasmáticos se encontraron dentro de lo normal, algunos investigadores recomiendan remover las proteínas antes del ensayo ORAC, puesto que

estas junto a otros antioxidantes endógenos contribuyen en un 75% a la capacidad antioxidante plasmática (28, 29). Mazza y cols. observaron incrementos de hasta un 50,6 % sobre el nivel del valor ORAC en plasma total cuatro horas después de una única ingesta de 100 g de un liofilizado de arándano gigante (*Vaccinium corymbosum*). En este mismo estudio se demostró la presencia en el plasma de las formas intactas (glicósidos y acetatos) de antocianos (28). Hasta ahora sabemos que *U. molinae* posee una mezcla compleja de polifenoles con una amplia distribución de pesos moleculares. En este conjunto, los taninos gálicos pueden hidrolizarse liberando ácido gálico, el cual asociado con los flavonoides y catequinas, una vez absorbidos, contribuyen significativamente a elevar la capacidad antioxidante del plasma. Recientemente, Lotito y Frei, estudiaron el efecto protector de los polifenoles aislados de manzana (*Malus domestica*) sobre la capacidad antioxidante ORAC *in vitro* y *ex vivo*. Sin embargo, cuando investigaron el efecto *in vivo* del consumo de cinco manzanas en ayunas en voluntarios sanos, el ORAC plasmático total, no fue diferente al de un grupo control (30). Los mismos investigadores empleando los modelos FRAP y *Ferric Reducing Ability of Plasma, ascorbate oxidase* (FRAP_{AO}) encontraron un aumento significativo de la capacidad antioxidante plasmática en individuos sometidos a la ingesta de manzanas. Este incremento, estaría asociado al contenido de fructosa

y azúcares que la originan. La fructosa en los alimentos aumenta los niveles de ácido úrico. Esta fructosa es rápidamente metabolizada a fructosa 1-fosfato mediante la enzima fructoquinasa. Este evento conduce a una disminución transiente en el ATP hepático y el fosfato inorgánico, ambos importantes inhibidores de la 5'-nucleotidasa y la AMP deaminasa, por lo que se favorece la degradación de AMP a urato (31). Estos hallazgos, aparentemente contradictorios, no hacen otra cosa más que confirmar lo variable de los resultados observados con otros alimentos ricos en antioxidantes, relacionados con la importancia de la matriz en la cual están insertos estos compuestos. En infusiones o extractos hidro-alcohólicos estas sustancias presentan muy buena solubilidad si se les compara con aquellos que están en un alimento, donde las proteínas y carbohidratos complejos alteran significativamente su biodisponibilidad. El valor ORAC es ampliamente utilizado como control de calidad de productos antioxidantes y en la evaluación de la capacidad antioxidante de frutas, verduras, suplementos dietarios, nutraceuticos, jugos y vinos (32, 33). Así por ejemplo, para el vino tinto el valor ORAC expresado en unidades Trolox corresponde a 2194 μM de Equivalentes Trolox/g (29) y el calculado para el infuso (1%) a 533.11 μM de Equivalentes Trolox/g. Recientemente, el ensayo ha experimentado una modificación importante, reemplazando la *R*-ficoeritrina como prueba fluorescente por fluoresceína. Esta última posee mayor fotoestabilidad, bajo costo, no interacciona con polifenoles y los productos de su reacción con AAPH están perfectamente caracterizados (34).

En conclusión, los resultados de este estudio muestran la actividad antioxidante del infuso (1%) de hojas de *Ugni molinae* y el incremento en la actividad antioxidante plasmática asociada a su ingesta. Actualmente, se están realizando estudios conducentes a caracterizar específicamente que metabolitos secundarios son responsables del efecto observado y su impacto en la capacidad antioxidante plasmática.

AGRADECIMIENTOS

Fuente de Financiamiento Proyectos Internos Universidad de Concepción P.I 202.074.030-1.0

BIBLIOGRAFÍA

- (1) Maxwell SR. (1995). Prospects for the use of antioxidant therapies. *Drugs* 49: 345-361.
- (2) Sohal RS, Weindruch R. (1996). Oxidative stress, caloric restriction and aging. *Science* 273: 59-63.
- (3) Meydani M. (2001). Nutrition interventions in aging and age-associated disease. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 928: 226-235.
- (4) Laurin D, Masaki KH, Foley DJ, White LR, Launer LJ. (2004). Midlife dietary intake of antioxidants and risk of late-life incident dementia: the Honolulu-Asia aging study. *American J. Epidemiol.* 159: 959-967.
- (5) Hagfors L, Leanderson P, Sköldstam L, Anderson J, Johansson G. (2003). Antioxidant intake, plasma antioxidants and oxidative stress in a randomized, controlled, parallel, Mediterranean dietary intervention study on patients with rheumatoid arthritis. *Nutr. J.* 2:5.
- (6) Stahl W, Sies H. (1997). Antioxidant defense: vitamins E and C and carotenoids. *Diabetes* 46: 14-18.
- (7) Halliwell B, Gutteridge JMC. (1989). *Free radicals in biology and medicine*. Ed. Clarendon Press, Oxford, Reino Unido.
- (8) Ng TB, Liu NGF, Wang ZT. (2000). Antioxidative activity of natural products from plants. *Life Sci.* 66(8): 709-723.
- (9) Hoffmann JA. (1991). *Flora silvestre de Chile zona araucana*. Ed. Fundación Claudio Gay, (2ª ed), Santiago, Chile. 160 pp.
- (10) Avello M. (2000). Estudio fitoquímico de las hojas de *Ugni molinae* Turcz. ("Murtilla") y evaluación de las propiedades antioxidantes de sus componentes. Tesis para optar al título de Químico Farmacéutico, Universidad de Concepción, Concepción, Chile.
- (11) Prior RL, Gouhua C. (2000). Analysis of botanicals and dietary supplements for antioxidant capacity: a review. *JAOAC* 83 (4): 950-956.
- (12) Glazer AN. (1990). Phycoerythrin fluorescence-based assay for reactive oxygen species. *Methods Enzymol.* 186:161-168.
- (13) Winston GW, Regoli F, Dugas AJ(Jr), Fong JH, Blanchard KA. (1998). A rapid gas chromatographic assay for determining oxyradical scavenging capacity of antioxidants and biological fluids. *Free Rad. Biol. Med.* 24: 480-493.
- (14) Tubaro F, Ghiselli A, Papuzzi P, Maiorino M, Ursini F. (1998). Analysis of plasma antioxidant capacity by competition kinetics. *Free Rad. Biol. Med.* 24:1228-1234.
- (15) Lin YL, Juan IM, Chen YL, Liang YC, Lin JK. (1996). Composition of polyphenols in fresh tea leaves and associations of their oxygen-radical-absorbing capacity with antiproliferative actions in fibroblast cells. *J. Agric. Food Chem.* 44: 1387-1394.

- (16) Cao G, Sofic E, Prior RL. (1996). Antioxidant and pro-oxidant behavior of flavonoids: structure-activity relationships. *Free Rad. Biol. Med.* 22: 749-760.
- (17) Wang H, Cao G, Prior RL. (1997). The oxygen radical absorbing capacity of anthocyanins. *J. Agric. Food Chem.* 45:304-309.
- (18) Cao G, Booth SL, Sadowki JA, Prior RL. (1998). Increases in human plasma antioxidant capacity following consumption of controlled diets high in fruits and vegetables. *Am. J. Clin. Nutr.* 68: 1081-1087.
- (19) Gugliucci A. (1996). Antioxidant effects of *Ilex paraguariensis*: induction of decreased oxidability of human LDL *in vivo*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 224(2): 338-344.
- (20) Ou B, Huang D, Hampsch-Woodill M, Flanagan J, Deemer E. (2002). Analysis of antioxidant activities of common vegetables employing oxygen radical absorbance capacity (ORAC) and ferric reducing antioxidant power (FRAP) assays; a comparative study. *J. Agric. Food Chem.* 50: 3122-3128.
- (21) Kinsella JE, Frankel E, German B, Kanner J. (1993). Possible mechanism for the protective role of antioxidants in wine and plant foods. *Food Technology* 85-89.
- (22) Prior RL, Cao G (1999). *In vivo* total antioxidant capacity: comparison of different analytical methods. *Free Radic. Biol. Med.* 27(11-12): 1173-1178.
- (23) Kedziora-Kornatowska K, Bartasz M, Mussur M, Zaslonka J, Kedziora J, Bartosz G. (2003). The total antioxidant capacity of blood plasma during cardiovascular bypass surgery in patients with coronary heart disease. *Cell. Mol. Biol. Lett.* 8:973-977.
- (24) Wang SY, Lin H-S. (2000). Antioxidant activity in fruits and leaves of blackberry, raspberry and strawberry varies with cultivate and developmental stage. *J. Agric. Food Chem.* 48: 140-146.
- (25) Abuja PM, Albertini R. (2001). Methods for monitoring oxidative stress, lipid peroxidation and oxidation resistance of lipoproteins. *Clin Chim Acta* 306: 1-17.
- (26) Baolu Z. (2003). Antioxidant effects of green tea polyphenols. *Chin. Sci. Bull.* 48 (4): 315-319.
- (27) Martínez-Flórez S, González-Gallego J, Culebras JM, Tuñón MJ. (2002). Los flavonoides: Propiedades y acciones antioxidantes. *Nutr. Hosp.* 17(6): 271 – 278.
- (28) Mazza G, Kay CD, Cottrell T, Holub BJ. (2002). Absorption of anthocyanins from blueberries and serum antioxidant status in human subjects. *J. Agric. Food Chem.* 50: 7731 - 7737.
- (29) Cao G, Russell R, Lischner M, Prior R. (1998). Serum antioxidant is increased by consumption of strawberries, spinach, red wine or vitamin C in elderly women. *J. Nutr.* 128: 23283-2390.
- (30) Lotito SB, Frei B. (2004). Relevance of apple polyphenols as antioxidant in human plasma: contrasting *in vitro* and *in vivo* effects. *Free Radic. Biol. Med.* 15; 36(2): 201-211.
- (31) Lotito SB, Frei B. (2004). The increase in human plasma antioxidant capacity after apple consumption is due to the metabolic effect of fructose on urate, not apple-derived antioxidant flavonoids. *Free Radic Biol. Med.* 15; 37(2): 251-258.
- (32) Prior RL, Hoang H, Gu L, Wu X, Bacchiocca M, Howard L, Hampsch-Woodill M, Huang D, Ou B, Jacob R. (2003). Assays for hydrophilic and lipophilic antioxidant capacity (oxygen radical absorbance capacity (ORAC(FL)) of plasma and other biological and food samples. *J. Agric. Food Chem.* 51(11): 3273-3279.
- (33) Wang H, Cao G, Prior R. (1996). Total antioxidant capacity of fruits. *J. Agric. Food Chem.* 44: 701-705.
- (34) Ou B, Hampsch-Woodill M, Prior RL. (2001). Development and validation of a improved oxygen radical absorbance capacity assay using fluorescein as the fluorescent probe. *J. Agric. Food Chem.* 49: 4619-4626.

Este artículo puede ser libremente distribuido y/o copiado para uso personal siempre que lo sea en su integridad. No se permite su modificación ni su uso parcial o total para fines comerciales. Si por cualquier razón Ud. desea redistribuirlo en gran cantidad le agradeceremos que nos lo informe. Todo trabajo basado en este artículo o derivado de su uso debe citar convenientemente la fuente.



<http://www.blacpma.cl>

Frases y citas

*Que se quede el infinito sin estrellas
o que pierda el ancho mar su inmensidad,
pero el negro de tus ojos que no muera
y el canela de tu piel se quede igual.*

Bobby Capó

*Si, era bella
Si, era muy bella
Pero vacía, pero tan fría
Que al abrazarla pensaba que estaba
abrazando una piedra*

Hernaldo Zúñiga

*Cuando una persona le dice a otra que se
ve muy joven, debe tener la certeza de que
se está envejeciendo*

Washington Irving

*Una carta dirigida a Dios fue enviada a
Roma desde Alemania en 1926. Fue
devuelta al remitente con la siguiente nota:
Dirección Desconocida*

Anónimo

*En cada niño que sonrío, hay un canto a la
dicha, a la vida y el amor*

Julio Martínez

*Señor,
Dame tu mano,
No me abandones...*

J. Salinas

*Las tierras pertenecen a sus dueños, pero
el paisaje es de quien sabe apreciarlo*

Upton Sinclair

*Nadie es lo suficiente pequeño o pobre
para ser ignorado*

Henry Millar

*La mujer ha de usar sus gracias con tal
tacto, que siempre le quede una por
descubrir*

Pitágoras

*El canal se complace pensando
que los ríos no existen sino para
traerle agua*

Rabindranath Tagore

*Un hombre es infinitamente más
complicado que sus pensamientos*

Paul Valéry

*Ayer me fui al cementerio,
con mi pena a terminar,
pero yo soy de suerte tan negra,
que no me dejaron entrar*

Alfredo Le Pera

*Los ríos mas profundos son
siempre los más silenciosos*

Quinto Curcio

*Se conoce el corazón del hombre
por lo que hace, y su sabiduría, por
lo que dice*

Ali Ben Abu Thaleb

*La soledad es la suerte de todos los
espíritus excelentes*

Arthur Schopenhauer

*Nada acerca más a Dios, que el
recuerdo de una santa madre*

Ozanam

*El que te creó a ti,
no se salvará de ti*

San Agustín

*Nunca estamos solos cuando
sabemos que ocupamos un lugar
en otro corazón*

Alejandra

Dios es mi copiloto

Anónimo

BLACPMA