



FACULTAD DE FARMACIA
ESCUELA DE FARMACIA

**Efecto de la radiación UV- B en el contenido
de polifenoles totales y capacidad
antioxidante en hojas de *Buddleja globosa*
Hope.**

Tesis para optar al título de Químico Farmacéutico.

ISABEL VICTORIA SÁEZ RUZ

Director de Tesis: Prof. Q.F. Marcela Escobar P.
Co-director de Tesis: Q.F. Daniela Irrázabal V.

2015

DEDICATORIA

A mi papá
y
a mi mamá.

Gracias.

No creas lo que tus ojos dicen,
solo muestran limitaciones,
mira con tu entendimiento,
descubre lo que ya sabes,
y hallarás la manera de volar.

AGRADECIMIENTOS

Primero, agradecer a mi Directora de Tesis Prof. Marcela Escobar por apoyarme y acogerme en momentos difíciles, gracias por todo.

A mi Co-Directora Q.F. Daniela Irarrázaval, por su gran disposición, consejos y apoyo en todo este proceso que no ha sido fácil.

Al Prof. Rodrigo Díaz y Prof. Georgina Sánchez por sus acotaciones y aporte a este trabajo.

Al equipo de trabajo del Laboratorio de Farmacopea Chilena por el apoyo recibido.

Al Laboratorio de Fotoquímica y a su encargada Prof. Georgina Sánchez, a quien conozco desde ya mucho tiempo siendo alumna y ayudante en su cátedra, una persona y profesional que admiro, respeto y estimo mucho, y de quien siempre he recibido apoyo y consejos que espero vea que siempre trato de escuchar y de asimilar en mí.

Al Laboratorio de Microbiología y sus encargados, Prof. Alejandro Dinamarca y Q.F. Natalia Romo por el apoyo y buena disposición para el uso de sus equipos.

A mis profesores Rocío Álvarez, Cecilia Rubio, Patricia Carreño, Patricia Acuña, Waldo Vergara, Juan Ojeda, a mis técnicos del laboratorio Juan Luis, Boris y a Cristina Pedraza, quienes no solo cumplen la labor educativa enseñando los

conocimientos necesarios, sino también criterio, respeto, amor a la profesión y vocación de servicio que son herramientas indispensables hoy en día.

A mis compañeros de U en el laboratorio, Víctor, conocerte ha sido una gran experiencia de cariño y admiración infinita, Francisco que has sido un partner y amigo, gracias por estar, hacerme reír mucho y darme ánimo cada vez que lo necesite, aprendí a conocerte y apreciarte en el camino superando barreras propias, y Rocío quien desde el primer momento se volvió mi confidente, amiga y muchas cosas más cuando no podía, ni te imaginas. Gracias a ustedes por hacer que el tiempo fuese más lindo y agradable en el laboratorio. También a mis compañeros y amigos de siempre, muchos desde antes, durante y después del período académico: Feñita, Verito, Favian, Lore, Vivi, Nicole, Jorge, Kathy, Normita, Jessy, Claudi, Paula y muchos más con quienes he pasado y conocido a través de los años y seguiremos pasando los próximos.

A Fran y Ana, quienes han sido amigas y Ana con su revolución artesanal, gracias por los paseos, salidas y conversaciones, Carito alegrando el día con su sonrisa siempre, Javi y Mati por la buena onda y el cariño, Gaby por tu simpatía, ternura y perseverancia, Jossy gracias por estar conmigo en todas, escucharme, apoyarme y ayudarme, Angelina por la confianza y la motivación am y a Kris quien para mí ha sido comprensión, alegría, apoyo, cariño y un ejemplo admirable de sacrificio y fuerza ante la adversidad, todos los días haces que los caminos difíciles ya no lo sean tanto, gracias a ti por ser como eres, se que llegarás lejos con tu espíritu, no mereces menos.

Seguramente se me olvidan muchos nombres, muchas personas, muchos recuerdos hermosos, gracias desde lo más profundo de mi corazón, a todos quienes he conocido en este camino que la vida puso un poco pedregoso, que no ha sido fácil, pero si no hubiesen estado ahí en ese momento nada sería como lo es hoy. Gracias al destino por cruzarlos en mi camino.

ÍNDICE GENERAL

DEDICATORIA	I
AGRADECIMIENTOS	III
ÍNDICE GENERAL	VI
ÍNDICE DE TABLAS	IX
ÍNDICE DE FIGURAS	X
ÍNDICE DE GRÁFICAS	XI
RESUMEN	1
SUMMARY	3
INTRODUCCION	4
Compuestos bioactivos en plantas y su origen	4
Compuestos fenólicos	5
Síntesis de metabolitos secundarios	7
Radiación UV	9
<i>Buddleja globosa</i> Hope	12
HIPOTESIS	13
OBJETIVOS	14
Objetivos generales	14
Objetivos específicos	14
MATERIALES	15
Reactivos	15

Equipos	16
MÉTODOS	17
Recolección de muestras	17
Tratamiento de la muestra	18
Secado y molienda	19
Preparación de los extractos	20
Extracto acuoso	20
Extracto hidroalcohólico	20
Determinación de Polifenoles Totales (PFT)	21
Determinación de Capacidad Antioxidante (CAOX)	22
FRAP	22
DPPH	24
Análisis estadístico	25
RESULTADOS	26
Recolección y secado	26
Determinación de PFT	26
Determinación de Capacidad Antioxidante	27
FRAP	27
DPPH	28
Correlación entre capacidad antioxidante y contenido de PFT y entre capacidades antioxidantes	28

DISCUSION	30
Recolección y secado	30
Determinación de PFT	31
Determinación de Capacidad Antioxidante	37
FRAP	37
DPPH	42
Correlación entre Capacidad Antioxidante y Contenido de PFT y entre Capacidades Antioxidantes	47
CONCLUSIONES	54
BIBLIOGRAFIA	56
ANEXO 1	67
ANEXO 2	69
ANEXO 3	70
ANEXO 4	71
ANEXO 5	72
ANEXO 6	73
ANEXO 7	74

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla N°1	Resumen de dosis de radiación UV-B aplicada a los distintos grupos de hojas de matico frescas.	19
Tabla N°2	Curva de calibrado de Ácido Gálico.	22
Tabla N°3	Curva de calibrado de $\text{FeSO}_4 \cdot 6 \text{H}_2\text{O}$.	24
Tabla N°4	Rendimiento del proceso de secado por liofilización.	26
Tabla N°5	Contenido de PFT para extracto acuoso e hidroalcohólico.	27
Tabla N°6	Capacidad antioxidante FRAP para extracto acuoso e hidroalcohólico.	27
Tabla N°7	Capacidad antioxidante DPPH para extracto acuoso e hidroalcohólico.	28
Tabla N°8	Coeficiente de Pearson (R^2) obtenido para las distintas comparaciones.	28
Tabla N°9	Concentración v/s Absorbancia para Acido Gálico.	70
Tabla N°10	Concentración v/s Absorbancia para FeSO_4 .	71

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura N°1	Estructura general de los flavonoides y posiciones de sustitución (Cushnie y Lamb, 2005).	6
Figura N°2	Factores de stress que inducen metabolismo secundario (Dixon y Paiva, 1995).	8
Figura N°3	Mecanismo de reacción SET (Prior y cols., 2005).	41
Figura N°4	Mecanismo de reacción HAT (Prior y cols., 2005).	45
Figura N°5	Hojas de <i>Buddleja globosa</i> Hope.	67
Figura N°6	Inflorescencia de <i>Buddleja globosa</i> Hope.	67
Figura N°7	Árbol de <i>Buddleja globosa</i> Hope.	68
Figura N°8	Lugar geográfico de recolección de hojas de <i>Buddleja globosa</i> Hope.	69

ÍNDICE DE GRAFICAS

Gráfica N°1	Curva de calibrado Acido Gálico.	70
Gráfica N°2	Curva de calibrado FeSO ₄ .	71
Gráfica N°3	Análisis correlación DPPH v/s PFT para extracto acuoso.	72
Gráfica N°4	Análisis correlación DPPH v/s PFT para extracto hidroalcohólico.	72
Gráfica N°5	Análisis correlación FRAP v/s PFT para extracto acuoso.	73
Gráfica N°6	Análisis correlación FRAP v/s PFT para extracto hidroalcohólico.	73
Gráfica N°7	Análisis correlación DPPH v/s FRAP para extracto acuoso.	74
Gráfica N°8	Análisis correlación DPPH v/s FRAP para extracto hidroalcohólico.	74

RESUMEN

Buddleja globosa Hope es una planta nativa de Chile con propiedades beneficiosas tales como: antioxidante, diurética, antiinflamatoria, antiséptica, analgésica y cicatrizante, así como de regeneración de la membrana mucosa en el caso de úlceras. Estas propiedades están asociadas a su contenido de compuestos fenólicos entre los que se incluyen flavonoides, ésteres feniletanoides y terpenoides como iridoides, sesquiterpenos, diterpenos y saponinas.

El objetivo de este trabajo fue evaluar el efecto del estrés inducido por la radiación UV-B postrecolección en el contenido de polifenoles totales y capacidad antioxidante de hojas de matico para extractos acuoso e hidroalcohólico. Se utilizaron 3 lámparas UV-B (TL 40W/12 UV-B Broadband Phototherapy, Philips) con una intensidad promedio de $436 \mu\text{W}/\text{cm}^2$ y distintos tiempos de exposición (30 s, 150 s y 300 s). La dosis final fue de $26,2 \text{ mJ}/\text{cm}^2$, $130,8 \text{ mJ}/\text{cm}^2$, $261,7 \text{ mJ}/\text{cm}^2$ respectivamente. Las hojas se mantuvieron 5 días en oscuridad a 20°C y 38- 45% HR en bolsas plásticas ventiladas para posteriormente ser secadas.

El resultado final mostró que existe un incremento en el contenido total de polifenoles y capacidad antioxidante proporcional al aumento de radiación UV-B en ambos extractos obteniéndose un mayor rendimiento en el extracto hidroalcohólico ($P < 0,05$). Se obtuvo una buena correlación entre capacidad antioxidante v/s contenido de polifenoles y también entre capacidades antioxidantes lo que indica los polifenoles podrían ser los mayores contributores de la actividad antioxidante y

que los compuestos presentes en ambos extractos pueden reducir oxidantes y atrapar radicales libres.

SUMMARY

Buddleja globosa Hope is a plant native to Chile with beneficial properties such as antioxidant, diuretic, anti-inflammatory, antiseptic, analgesic and healing and regeneration of the mucous membrane in the case of ulcers. These properties are associated with its phenolic content. Including flavonoids and terpenoids phenylethanoid esters as iridoids, sesquiterpenes, diterpenes and saponins are included.

The aim of this study was to evaluate the effect of stress induced by UV-B radiation in postharvest total polyphenol content and antioxidant capacity of leaves matico for aqueous and alcoholic extracts. Three UV-B lamps (TL 40W/12 Broadband UVB Phototherapy, Philips) are used with an average intensity of $436 \mu\text{W}/\text{cm}^2$ and different exposure times (30 s, 150 s and 300 s). The final dose was $26.2 \text{ mJ}/\text{cm}^2$, $130.8 \text{ mJ}/\text{cm}^2$, $261.7 \text{ mJ}/\text{cm}^2$. The leaves remained five days in the dark at 20°C and 38- 45% RH in ventilated plastic bags and then are dried.

The final result showed that there is an increase in the total polyphenol content and antioxidant capacity proportional to the increase in UV-B radiation in both extracts obtaining a higher yield in the hydroalcoholic extract. A good correlation was obtained between antioxidant capacity v/s polyphenol content and antioxidants capabilities among indicating that polyphenols are the mayor contributors to higher antioxidant activity and the compounds present in both extracts can be reducing and scavenging free radicals.

INTRODUCCION

Las plantas medicinales son un recurso existente desde la antigüedad y han sido aprovechadas por diversas culturas, a través de la historia, como fuente de preparados medicamentosos, contribuyendo hasta mediados del siglo XX a ser el recurso terapéutico para disminuir síntomas y prevenir enfermedades. Es así como en cada región se ha desarrollado una forma de curar única y característica que utiliza especies endémicas. Con el tiempo estas terapias han pasado a conformar la medicina tradicional que ha sido preservada por los pueblos originarios (Avello y Cisternas, 2010; Parada, 2012).

Hoy en día se sabe que esta práctica se sustenta en la presencia de principios activos o constituyentes con acción terapéutica que se encuentran presentes en ellas.

Compuestos bioactivos en plantas y su origen

Gracias a su complejo metabolismo, las plantas constituyen una fuente de compuestos que son caracterizados por una enorme diversidad química de la cual sólo una pequeña fracción ha sido estudiada en sus propiedades bioactivas habiendo variedades conocidas y no conocidas con actividades farmacológicas aún por descubrir (Avello y Cisternas, 2010).

Estos compuestos poseen diversas actividades terapéuticas en el hombre, tales como antiinflamatorias, anticarcinogénicas y anti-ateroscleróticas, entre otras, que

pueden ser relacionadas a su contenido de polifenoles y su actividad antioxidante (Chung y cols., 1998; Wollgast & Anklam, 2000; Wong y cols., 2006). Esta función antioxidante incluye: i) atrapador de radicales libres; ii) protección y regeneración de otros antioxidantes de la dieta (ej. Vitamina E) y iii) quelación de iones metálicos pro-oxidantes tales como hierro y cobre (Sepúlveda y cols., 2004; Huang y cols., 2007).

Compuestos fenólicos

Los polifenoles son compuestos derivados del metabolismo secundario de los vegetales. Son constituyentes naturales de las plantas y representan un amplio grupo de sustancias químicas con diferentes estructuras, propiedades químicas y actividad biológica (Bravo, 1998; Gutiérrez y cols., 2008, Haminiuk y cols., 2012).

Su estructura fundamental se caracteriza por la presencia de al menos un anillo bencénico que contiene como mínimo uno o más sustituyentes hidroxilo libre o formando parte de otra función: éster, éter, heterósido (ver Figura N°1). Se encuentran comúnmente conjugados con uno o más residuos glucídicos aunque también existen uniones directas del azúcar al átomo de carbono aromático (Bravo, 1998; Bruneton, 2001; Gutiérrez y cols., 2008).

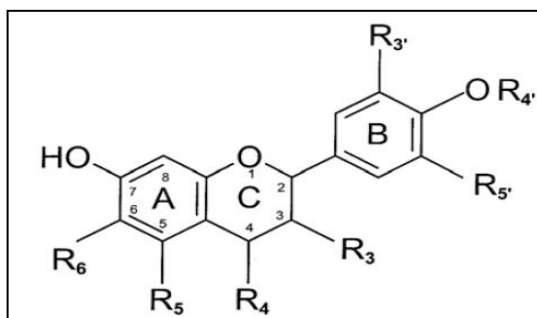


Figura N°1: Estructura general de los flavonoides y posiciones de sustitución
(Cushnie y Lamb, 2005).

Los polifenoles provienen de la ruta del ácido shikímico y de la ruta del acetato malonato. Tanto el ácido acético como el ácido shikímico derivan del metabolismo de la glucosa (Bravo, 1998). El ácido shikímico da origen a los aminoácidos aromáticos fenilalanina y tirosina y a partir de estos a fenoles sencillos, ácidos fenólicos (benzoicos, cinámicos, etc.), cumarinas, lignanos, antocianos y taninos (Dixon y Paiva, 1995).

El ácido acético, en su forma activa, Acetil- CoA, o posteriormente como Malonil-CoA, es el punto de partida de la síntesis de los ácidos grasos en la ruta primaria, pero también es el punto de partida de la síntesis de flavonoides en la ruta secundaria, de esta vía provienen compuestos normalmente policíclicos como cromonas, isocumarinas, orcinoles, depsidonas, xantonas, antraquinonas y heterósidos antracénicos (Murcia y cols., 2003).

Muchos compuestos con dos o más núcleos fenólicos, tales como flavonoides, estilbenos, pironas y xantonas, entre otros, son el producto de una biosíntesis

mixta, puesto que derivan simultáneamente del ácido shikímico y del acetato (Murcia y cols., 2003).

Síntesis de metabolitos secundarios

Los compuestos fenólicos son sintetizados durante el desarrollo normal de las plantas y son esenciales para el crecimiento y reproducción de estas, también actúan como antipatógenos y contribuyen a la pigmentación de los alimentos y vegetales (Haminiuk y cols., 2012; Chordi, 2013).

La presencia de estos también puede ser influenciada por diversas situaciones que producen estrés en el vegetal tales como animales, microorganismos, otras plantas, agentes fitopatógenos como virus y viroides, déficit o exceso de agua, temperaturas extremas, salinidad, metales pesados, toxinas, carencia de minerales y radiación UV, las cuales se encuentran resumidas en la Figura N°2 (Dixon y Paiva, 1995; Bravo, 1998; Haminiuk y cols., 2012).

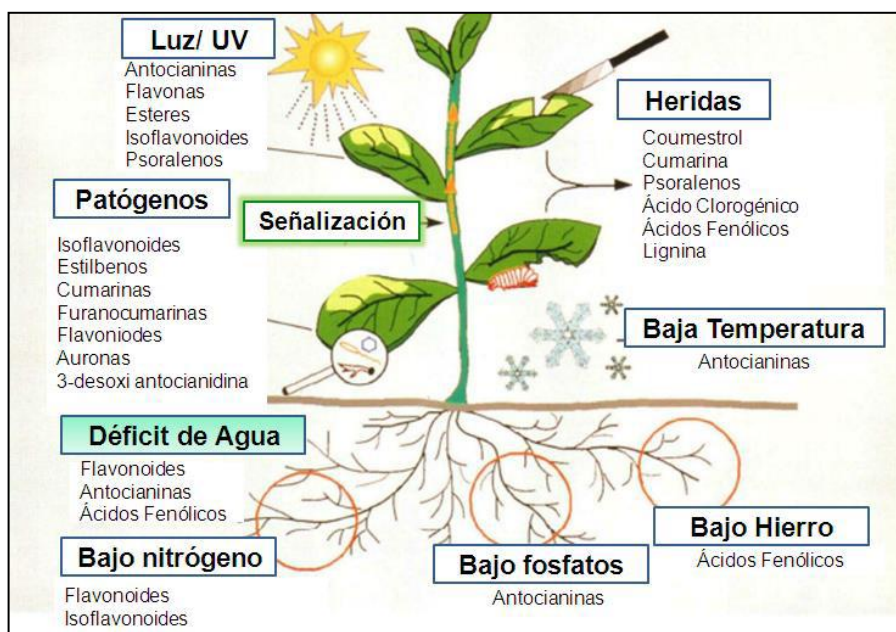


Figura N°2: Factores de stress que inducen metabolismo secundario (Dixon y Paiva, 1995).

El incremento de los compuestos fenólicos en respuesta al estrés en vegetales es uno de los fenómenos más estudiados (Sepúlveda y cols., 2004; Surjadinata y Cisneros-Zevallos, 2012). El aumento del contenido de polifenoles genera cambios tales como la síntesis de enzimas que degradan la pared celular de microorganismos, alteración en la composición y estructura de la pared celular vegetal, formando una barrera más rígida y menos digerible para los agresores (lignanós). Asimismo y como parte de la protección química, está la producción de metabolitos secundarios con actividad antimicrobiana, en contra de herbívoros, o con actividad antioxidante (Sepúlveda y cols., 2004).

Un claro ejemplo de este fenómeno se ve reflejado en estudios realizados por Surjadinata y Cisneros-Zevallos (2012) en distintas variedades de zanahorias

sometidas a estrés físico (heridas por corte) que han mostrado un incremento de 2,5 y 12,4 veces en compuestos fenólicos y capacidad antioxidante respectivamente después de cuatro días de almacenamiento en comparación a controles sin estrés, encontrándose además una relación lineal entre la intensidad de la agresión y el incremento de estos compuestos.

Radiación UV

La radiación UV corresponde a una radiación no ionizante que es parte del espectro electromagnético emitido por el Sol, con una longitud de onda que abarca de 100 a 400 nm (Rivera-Pastrana y cols., 2007). Esta tiene tres componentes: la radiación UV-A entre los 320 y 400 nm, UV-B comprendida entre los 280 y 320 nm y UV-C que abarca los 200 y 280 nm (Carrasco, 2009; Takshak y Agrawal, 2014). La radiación UV-B que alcanza la superficie de la Tierra representa el 1,5% del espectro total, siendo la mayor parte de la radiación que llega del tipo UV-A (6,3%). La radiación UV-C es absorbida completamente por el ozono de la atmósfera terrestre y no llega a la Tierra (Hollósy, 2002).

La radiación UV-B es vital para el funcionamiento de los ecosistemas en el control de procesos fotobiológicos, factores ambientales y ciclos naturales, pero también puede ser perjudicial cuando la proporción de ésta aumenta por sobre determinados límites, produciendo alteraciones en la química y fisiología de la planta (cambios anatómo-morfológicos, metabólicos y a nivel molecular) penetrando en la hoja y siendo absorbida por cromóforos y/o biomoléculas

susceptibles a su efecto dañino tales como proteínas y Ácido Desoxirribonucleico (ADN) las cuales presentan electrones π en su estructura que absorben fuertemente esta radiación (Hollósy, 2002; Carrasco, 2009).

El estudio de los efectos de la radiación UV también genera gran interés puesto que hay evidencias del efecto positivo en el aumento de la síntesis de compuestos fenólicos tales como fenoles y flavonoides, los que se acumulan en células de la epidermis de diversas especies vegetales absorbiendo entre 289-360 nm no interfiriendo en la absorción de la radiación fotosintéticamente activa (PAR: Photosynthetically Active Radiation) (400-700 nm), reduciendo el efecto deletéreo sobre distintos componentes celulares por el aumento de la capacidad de las hojas de bloquear este tipo de radiación (Cisneros-Zevallos, 2003; Carrasco, 2009).

El estudio del efecto de la radiación UV en plantas medicinales también es importante para determinar la influencia sobre los compuestos activos presentes en éstas. Así lo demuestran ensayos en cultivos de paico (*Chenopodium ambrosioides*) y ortiga (*Urtica dioica*) tratados con distintas dosis de radiación UV-C (3,2 KJ/m², 4,0 KJ/m², 6,0 KJ/m²), presentando ambas especies irradiadas diferencias significativas en el contenido de polifenoles totales con respecto sus respectivos controles para todas las dosis de radiación recibidas. Para la medición de capacidad antioxidante en paico solo la dosis de 6,0 kJ/m² presentó un aumento significativo en comparación a la muestra control. Con respecto a la

ortiga, todos los tratamientos presentaron un incremento significativo en la capacidad antioxidante para las distintas dosis aplicadas respecto del control (Charpentier, 2013).

Estudios realizados por Du y cols. (2012) en el que se evaluó el efecto de bajas dosis de radiación UV-B en zanahorias con distintos estilos de corte que generaron distintas áreas de exposición totales, con una dosis total de $141,4 \pm 1,6$ mJ/cm^2 , tiempo de exposición de 14 s y condiciones de almacenamiento de 15°C y 45% HR (Humedad Relativa) por 72 h, revelaron un incremento significativo en polifenoles totales, actividad antioxidante y síntesis de Fenilalanina Amonio Liasa (Phenylalanine Ammonia Lyase: PAL). También se encontró que los niveles de actividad antioxidante fueron proporcionales al área de exposición de las muestras.

Artemisia annua, una planta con propiedades antimaláricas, tratada con dosis de radiación UV-B y UV-C ($4,2 \text{ kJ/m}^2/\text{día}$) por 30 min cada día, por un tiempo total de 14 días y en distintos estadios de crecimiento (plántula, pre-floración, botón, post-floración), mostró claramente que la radiación UV-B y UV-C induce un aumento del contenido del componente activo artemisina en diferentes partes aéreas de éstas para los diferentes estadios de desarrollo de la planta (Rai y cols., 2011).

Dolzhenko y cols. (2010) expusieron *Mentha piperita* L. a una dosis total de $7,1 \text{ kJ/m}^2/\text{día}$ de radiación UV-B por 1 h en plantas con crecimiento al aire libre y en cámara de crecimiento artificial, resultando un incremento significativo del

contenido fenólico en las plantas cultivadas en ambas condiciones de crecimiento respecto del cultivo control.

Buddleja globosa Hope

Buddleja globosa Hope, perteneciente a la familia Buddlejaceae, comúnmente llamado "matico", "matico chileno", "pañil" o "palguín", es una especie nativa de Chile, Perú y Argentina que se encuentra comúnmente desde la zona central hasta la Patagonia de forma silvestre y también en casas y jardines domésticos (Houghton, 2003; Vogel y cols., 2010). Es un arbusto siempreverde de 1,5 a 3 m de altura, con tallos subleñosos amarillentos, hojas ovalado-lanceoladas, rugosas, grisáceas en su cara inferior y agudas en la punta, de 3-15 cm de largo y 1-5 cm de ancho. Sus semillas son numerosas, con forma poliédrica y menor a 1 mm de largo (MINSAL, 2010) (ver Anexo 1).

Entre los compuestos activos encontrados en *Buddleja globosa* se incluyen flavonoides, ésteres feniletanoides y terpenoides incluyendo iridoides, sesquiterpenos, diterpenos y saponinas (Pardo y cols., 1993; Liao y cols., 1999; Mensah y cols., 2001; Houghton, 2003), a los que se ha atribuido propiedades beneficiosas tales como: antioxidante, diurética, antiinflamatoria, antiséptica, analgésica y cicatrizante, así como la regeneración de la membrana mucosa en el caso de úlceras en variadas formas de presentación como compresas, infusión, polvos y ungüentos (Backhouse y cols., 2008a; Vogel y cols., 2010; Wilkens y cols., 2013).

HIPOTESIS

"Si la biosíntesis de compuestos polifenólicos aumenta en vegetales en respuesta al estrés de la radiación UV-B, entonces las hojas de *Buddleja globosa* Hope sometidas a tratamiento de irradiación UV-B postrecolección presentarán un mayor contenido de polifenoles totales y capacidad antioxidante que las hojas sin tratamiento".

OBJETIVOS

Objetivo general

- Evaluar el efecto del estrés inducido por la radiación UV-B postrecolección en el contenido de polifenoles totales y capacidad antioxidante de hojas de *Buddleja globosa* Hope.

Objetivos específicos

1. Recolectar, seleccionar y secar adecuadamente hojas de *Buddleja globosa* Hope para asegurar un material de buena calidad.
2. Cuantificar el contenido de compuestos fenólicos totales y determinar la capacidad antioxidante en hojas de *Buddleja globosa* Hope sometida a distintas dosis de radiación UV-B.
3. Establecer una posible correlación entre el contenido de polifenoles y capacidad antioxidante y entre los distintos métodos para medir capacidad antioxidante.
4. Comparar estadísticamente el contenido de polifenoles totales y capacidad antioxidante de hojas de *Buddleja globosa* Hope sometidas a distintas dosis de radiación UV-B.

MATERIALES

Reactivos

- Agua destilada.
- Metanol técnico 99,8%, Vimaroni.
- Reactivo Folin Ciocalteau, Merck.
- Ácido acético min. 99,8%, Sigma.
- HCl 37% p.a., Sigma.
- Ácido gálico p.s., Merck.
- Carbonato de Sodio anhidro p.a., Sigma.
- Acetato de sodio trihidrato p.a., Merck.
- 2, 4, 6- Tripiridil-s- Triazina (TPTZ) p.a. 99,0%, Fluka.
- Cloruro férrico GR hexahidrato 99,0%, Loba.
- Sulfato ferroso heptahidrato p.a., Merck.
- 2,2- difenil- 1- picrilhidrazil (DPPH) p.a., Sigma.
- Papel filtro Munktell grado 388 (rápido).

p.a.: para análisis ; p.s.: para síntesis

Equipos

- Balanza granataria Radwag PS360C2.
- Balanza analítica Radwag AS220C2.
- Liofilizador Modelo Benchtop 2.0K ES.
- Molino de laboratorio IKA A11 Basic.
- Tamiz N°45, 355 µm.
- Tamizadora Electromagnetic Sieve Shaker EMS- 8.
- Baño de ultrasonido Elmasonic E 30 H.
- Estufa de secado BINDER SERIES ED.
- Radiómetro UVX con sensor UVX- 31 UV-B.
- Baño termostático Memmert WNB- 10.
- Centrífuga Eppendorf Modelo 5702R.
- Placa calefactora Thermo Scientific Cimarec.
- Vórtex MaxiMix II.
- Espectrofotómetro UV- Vis Shimadzu UV- 1800.
- Desecadora.

MÉTODOS

Recolección de muestras

Las muestras utilizadas corresponden a hojas de matico recolectadas en el mes de Enero de 2015 desde jardines situados en la comuna de Concón (Provincia de Valparaíso, Región de Valparaíso, Chile, Latitud Sur 32°56'19'', Longitud Oeste 71°31'32'') (ver Anexo 2).

Esta zona posee un clima templado-cálido de tipo costero que se caracteriza por una estación seca prolongada (7-8 meses) y una gran cantidad de nubosidad durante todo el año, siendo de mayor intensidad en los meses de invierno y asociada a nieblas y lloviznas.

Las variaciones de temperatura son menores por la influencia oceánica, entre el mes más cálido y el más frío la diferencia oscila entre 5-6°C con un promedio anual de 14°C. La humedad atmosférica es alta con un promedio de 82%. Las precipitaciones superan los 350 mm anuales y entre los meses de mayo y agosto precipita más del 80% del total anual (ONEMI, 2008; Meteorología de Chile, 2015).

Las muestras recolectadas se limpiaron y seleccionaron descartando las que estuviesen rotas y decoloradas, obteniendo un total de 547,8 g.

Tratamiento de la muestra

Las hojas se separaron en 5 grupos denominados de la siguiente manera:

- **C₀**: Grupo control sin tratamiento con incubación de 0 día.
- **C₅**: Grupo control sin tratamiento con incubación de 5 días.
- **R₁**: Grupo con tratamiento de 1 minuto e incubación de 5 días.
- **R₅**: Grupo con tratamiento de 5 minutos e incubación de 5 días.
- **R₁₀**: Grupo con tratamiento de 10 minutos e incubación de 5 días.

Cada uno de los grupos a su vez fue subdividido en 3 subgrupos (A, B y C).

Los grupos denominados C₅, R₁, R₅ y R₁₀ fueron llevados a incubación, siendo este proceso el almacenamiento de las hojas por un período de 5 días en condiciones de oscuridad y temperatura promedio de 20°C y 38-45% HR, con la finalidad de dar tiempo a la respuesta metabólica en las hojas de matico después de la exposición a radiación UV-B.

Para el proceso de irradiación se utilizaron 3 lámparas UV-B (TL 40W/12 UV-B Broadband Phototherapy, Philips). La intensidad de la radiación fue medida con radiómetro digital con sensor UV-B (UVX Radiometer, UVX 31 Sensor, UVP).

Las hojas fueron irradiadas a una distancia de 41 cm, una intensidad promedio de 436 $\mu\text{W}/\text{cm}^2$ y distintos tiempos (30 s, 150 s y 300 s) por una cara de la hoja para posteriormente recibir el mismo tiempo de tratamiento por la otra cara. La

temperatura inicial fue de 21,9°C llegando a una temperatura final de 24°C. La dosis final de radiación a la que fueron expuestas las hojas frescas de matico se resumen en la tabla N°1:

Tabla N°1: Resumen de dosis de radiación UV-B aplicada a los distintos grupos de hojas de matico frescas.

Grupos	Tiempo de exposición (s)	Dosis de UV-B (mJ/cm ²)	Tiempo de incubación (días)
C ₀ (Control)	-	-	-
C ₅ (Control)	-	-	5
R ₁	60	26,2	5
R ₅	300	130,8	5
R ₁₀	600	261,7	5

La muestra denominada C₀ fue congelada para ser liofilizada inmediatamente, el resto de las muestras (C₅, R₁, R₅ y R₁₀) fueron incubadas según las condiciones descritas anteriormente. Una vez transcurrido este tiempo las muestras fueron también congeladas y liofilizadas.

Secado y molienda

Una vez finalizado el proceso de incubación, las muestras fueron pesadas y colocadas en bolsas plásticas y estas a su vez dentro de un recipiente de vidrio para ser congeladas por un tiempo mínimo de 5 h. Posteriormente se colocó el frasco en el liofilizador para ser secadas durante 72 h. Se obtuvo el peso final de cada bolsa con muestra.

Las muestras ya secas fueron pulverizadas con molinillo eléctrico. El polvo obtenido se hizo pasar a través de un tamiz de malla # 45 (355 μm). Las muestras fueron puestas en recipientes plásticos previamente rotulados y almacenadas a 4°C para sus posteriores análisis.

Preparación de los extractos

- **Extracto acuoso:** Se utilizó el protocolo descrito Wong y cols. (2006) con modificaciones.

Se pesó 0,5 g de muestra en tubo Falcon de 50 mL y se adicionó 10 mL de agua destilada a temperatura ambiente. Se colocó en baño de agua a 100°C por 30 min agitando cada 10 min en vórtex. Se enfrió a temperatura ambiente y se centrifugó a 4.400 rpm por 15 min a 4°C. Se separó el sobrenadante y el residuo sólido se sometió a un nuevo proceso de extracción. Se juntaron ambos sobrenadantes, se filtró por gravedad y se llevó a un volumen final de 25 mL con agua destilada. El extracto obtenido se almacenó a 4°C.

- **Extracto hidroalcohólico:** Se utilizó el protocolo descrito por ISO 14502-1 (2005).

Se pesó 0,5 g de muestra en tubo Falcon de 50 mL y se adicionó 10 mL de la mezcla metanol:agua (70:30) que previamente fue calentada a 70°C en baño termostático. Se colocaron los tubos en baño a 70°C por 10 min agitando cada 5 min en vórtex. Se dejó enfriar a temperatura ambiente y se centrifugó a 4.400 rpm por 15 min a 4°C. Se separó el sobrenadante y el residuo sólido se sometió a

un nuevo proceso de extracción. Se juntaron ambos sobrenadantes, se filtró por gravedad y se llevó a un volumen final de 25 mL con la mezcla metanol:agua (70:30). El extracto obtenido se almacenó a 4°C.

Todos los análisis se realizaron al día siguiente de la preparación de los extractos.

Determinación de Polifenoles Totales (PFT)

Para este ensayo se usó el método de Folin- Ciocalteu (FC) (1927) según lo descrito por ISO 14502-1 (2005) en el cual se observa la formación de una coloración azul que presenta una absorbancia a 750 nm, y cuya intensidad es proporcional a la concentración de polifenoles en la muestra.

Muestra: Se tomó 1 mL del extracto madre y se llevó a un volumen final de 10 mL en matraz aforado con agua destilada. De esta dilución se tomó 1 mL en un tubo de ensayo, se adicionó 5 mL de reactivo FC (1:10) incubándose por 8 min protegido de la luz. Transcurrido el tiempo de incubación se adicionó a la mezcla 4 mL de Na₂CO₃ 7,5% p/v y se incubó por 1 h en oscuridad. Una vez finalizado el tiempo de incubación se midió la absorbancia de todas las muestras a 765 nm en un espectrofotómetro UV- Vis.

Todas las mediciones se realizaron por duplicado.

Los resultados obtenidos se expresaron como mg Equivalentes de Acido Gálico (GAE:Gallic Acid Equivalent)/ 100 g de muestra en base seca (b.s.).

Curva de calibrado Ácido Gálico: Se preparó una solución estándar de Ácido Gálico de 1 mg/mL de la cual se tomó 0, 1, 2, 3, 4, 5 y 6 mL respectivamente y se llevaron a un volumen final de 100 mL con agua destilada. Cada punto de la curva se realizó utilizando el mismo protocolo de la muestra. Para el blanco se utilizó agua destilada.

Tabla N°2: Curva de calibrado de Ácido Gálico.

Punto	Alícuota (mL)	Volumen final (mL)	Concentración (µg/mL)
1	1,0	100	10
2	2,0	100	20
3	3,0	100	30
4	4,0	100	40
5	5,0	100	50
6	6,0	100	60

Determinación de Capacidad Antioxidante (CAOX)

Se evaluó la capacidad antioxidante utilizando dos métodos: la decoloración del radical estable 2,2-difenil-1-picrilhidrazil (DPPH) expresada en % Inhibición DPPH/100 g de muestra en b.s.; y el método FRAP (Ferric Reducing Antioxidant Power) basado en la reducción de Fe^{+3} a Fe^{+2} expresado en moles $FeSO_4$ /100 g de muestra en b.s. (Sharma y cols., 2009; Benzie y Strain, 1996).

- **FRAP:** Se realizó el protocolo descrito por Benzie y Strain (1996) con modificaciones:

Reactivo FRAP: Se preparó mezclando los siguientes reactivos en proporción 10:1:1 (Buffer Acetato 300 mmol/L, pH 3,6 [3,1 g $C_2H_3NaO_2 \cdot 3 H_2O$ + 16 mL $C_2H_4O_2$ para 1 L de solución]; TPTZ 10 mmol/L en HCl 40 mmol/L; $FeCl_3 \cdot 6 H_2O$ 20 mmol/L). El reactivo se preparó fresco diariamente, manteniéndose a 37°C en baño termostático.

Muestra: Se tomó 1 mL del extracto madre y se llevó a un volumen final de 10 mL con agua destilada. La mezcla de reacción se realizó adicionando 600 μ L de agua destilada, 200 μ L de muestra diluida y 6 mL de reactivo FRAP a 37°C al tubo de ensayo. Se incubó en baño termostático a 37°C por 5 min. Se agitó y se monitoreó la cinética de formación del complejo Fe^{+2} - TPTZ en espectrofotómetro UV- Vis por 5 min con intervalos de medición de 0,5 s. La lectura tomada a los 4 min fue seleccionada para la realización de los cálculos. Todas las mediciones se realizaron por duplicado. Los resultados se expresaron como moles $FeSO_4$ / 100 g de muestra en b.s.

Curva de calibrado $FeSO_4 \cdot 6 H_2O$: Se preparó una solución estándar de $FeSO_4 \cdot 6 H_2O$ 2 mM de la cual se tomaron alícuotas entre 0 y 1,4 mL y se llevaron a un volumen final de 10 mL con agua destilada. Cada punto de la curva de calibrado se realizó siguiendo el mismo procedimiento de la muestra. Para el blanco se utilizó agua destilada.

Tabla N°3: Curva de calibrado de $\text{FeSO}_4 \cdot 6 \text{H}_2\text{O}$.

Punto	Alícuota (mL)	Volumen final (mL)	Concentración (mM)
1	1,0	10	0,2
2	2,0	10	0,4
3	3,0	10	0,6
4	4,0	10	0,8
5	5,0	10	1,0
6	6,0	10	1,2
7	7,0	10	1,4

- **DPPH:** Para este ensayo se siguió la metodología descrita por Sharma y cols. (2009) con modificaciones.

Solución DPPH: Se preparó una solución de DPPH en metanol 200 μM fresca para cada análisis, siendo la concentración en el tubo de reacción final 50 μM . Para ello se pesó aproximadamente 3,94 mg de DPPH por adición y se llevó a un volumen final de 50 mL con metanol en matraz de aforo protegido de la luz.

Muestra: Se tomó 1 mL del extracto madre y se llevó a un volumen final de 100 mL en matraz aforado con agua destilada. Se tomó 6 mL de muestra en un tubo de ensayo envuelto en papel aluminio, se adicionó 2 mL de solución DPPH 200 μM y se incubó a 30°C por 20 min. Una vez finalizado este tiempo se midió la absorbancia de las muestras a 517 nm en espectrofotómetro UV-Vis realizando todas las mediciones por duplicado.

El resultado se expresó como % de Inhibición DPPH/100g de muestra en b.s. según la siguiente fórmula:

$$\% \text{ Inhibición} = \frac{A_0 - A_m}{A_0} \times 100$$

En donde:

A_0 : Absorbancia del tubo de reacción sin muestra.

A_m : Absorbancia del tubo con muestra.

Análisis Estadístico

Los valores experimentales obtenidos se presentan como Promedio \pm Desviación Estándar de todas las mediciones.

Se realizó el análisis de varianza ANOVA y el test no paramétrico de Wilcoxon con un 95% de confianza para la comparación entre los grupos. Las diferencias entre los grupos analizados se determinaron aplicando el test de Tukey para ANOVA para encontrar significancias estadísticas entre los grupos comparados.

Los datos se analizaron con el programa estadístico STATA 12.1.

RESULTADOS

Recolección y secado

Como resultado de la recolección manual se obtuvo 547,8 g de hojas frescas las que se secaron por medio del proceso de liofilización obteniéndose los rendimientos por grupo que se resumen en la tabla N°4.

Tabla N°4: Rendimiento del proceso de secado por liofilización.

Grupo	Peso hojas frescas (g)	Peso seco (g)	Contenido de agua (%)	Peso hojas secas (%)
C ₀	36,4±0,0 ^a	11,32±0,4 ^a	68,9±1,0 ^a	31,1±1,0 ^a
C ₅	36,4±0,0 ^a	10,5±0,2 ^a	70,1±0,5 ^a	28,9±0,5 ^a
R ₁	37,0±0,3 ^a	10,8±0,5 ^a	70,8±1,2 ^a	29,2±1,2 ^a
R ₅	36,3±0,2 ^a	10,7±0,2 ^a	70,4±0,5 ^a	29,6±0,5 ^a
R ₁₀	36,5±0,3 ^a	11,3±0,2 ^a	69,1±0,2 ^a	30,9±0,2 ^a

Valores con la misma letra en cada columna no presentan diferencias estadísticamente significativas según test ANOVA (P>0,05).

Determinación de Polifenoles Totales

Los valores obtenidos para PFT presentados en la Tabla N°5 fueron calculados a partir de la ecuación de la recta obtenida a través de la curva de calibrado de Ácido Gálico descrita en el Anexo 3.

Tabla N°5: Contenido de PFT para extracto acuoso e hidroalcohólico.

PFT (mg GAE/100g de muestra en b.s.)		
Grupo	Extracto Acuoso	Extracto Hidroalcohólico
C₀	98,7 ± 4,7 ^{a,1}	118,4 ± 5,2 ^{a,2}
C₅	101,8 ± 4,8 ^{a,c,1}	118,5 ± 10,2 ^{a,2}
R₁	107,3 ± 24,5 ^{a,d,1}	130,5 ± 21,7 ^{a,b,2}
R₅	110,8 ± 2,9 ^{b,c,d,1}	137,8 ± 2,7 ^{b,2}
R₁₀	117,2 ± 9,4 ^{b,d,1}	152,5 ± 5,3 ^{c,2}

Valores con la misma letra en cada columna no presentan diferencias estadísticamente significativas según el test ANOVA seguido del test de Tukey y el método no paramétrico de Wilcoxon ($P > 0,05$). Valores con el mismo número en cada fila no presentan diferencias estadísticamente significativas según el test de Tukey y el método no paramétrico de Wilcoxon ($P > 0,05$).

Determinación de Capacidad Antioxidante

- **FRAP:** Los valores obtenidos para FRAP presentados en la Tabla N°6 fueron calculados a partir de la ecuación de la recta obtenida a través de la curva de calibrado de $\text{FeSO}_4 \cdot 6 \text{H}_2\text{O}$ descrita en el Anexo 4.

Tabla N°6: Capacidad antioxidante FRAP para extracto acuoso e hidroalcohólico.

FRAP (moles FeSO_4 /100 g de muestra en b.s.)		
Grupo	Extracto Acuoso	Extracto Hidroalcohólico
C₀	1,70 ± 0,12 ^{a,1}	2,08 ± 0,12 ^{a,2}
C₅	1,69 ± 0,16 ^{a,1}	2,26 ± 0,09 ^{a,d,2}
R₁	1,72 ± 0,34 ^{a,c,1}	2,20 ± 0,48 ^{b,d,2}
R₅	1,88 ± 0,16 ^{b,c,1}	2,39 ± 0,10 ^{b,d,2}
R₁₀	2,00 ± 0,12 ^{b,1}	2,75 ± 0,26 ^{c,2}

Valores con la misma letra en cada columna no presentan diferencias estadísticamente significativas según el test ANOVA seguido del test de Tukey y el método no paramétrico de Wilcoxon ($P > 0,05$). Valores con el mismo número en cada fila no presentan diferencias estadísticamente significativas según el test de Tukey y el método no paramétrico de Wilcoxon ($P > 0,05$).

- **DPPH:** Los valores obtenidos para DPPH presentados en la Tabla N°7 fueron calculados a partir de la fórmula para % Inhibición DPPH descrita en la metodología de este trabajo.

Tabla N°7: Capacidad antioxidante DPPH para extracto acuoso e hidroalcohólico.

DPPH (% Inhibición DPPH /100 g de muestra en b.s.)		
Grupo	Extracto Acuoso	Extracto Hidroalcohólico
C₀	33,4±2,0 ^{a,1}	41,9±10,3 ^{a,2}
C₅	37,1±1,4 ^{b,1}	43,0±4,8 ^{a,2}
R₁	37,6±4,9 ^{b,1}	48,0±5,0 ^{a,2}
R₅	38,3±1,3 ^{b,1}	49,5±2,0 ^{a,2}
R₁₀	53,2±1,1 ^{c,1}	55,0±2,1 ^{b,2}

Valores con la misma letra en cada columna no presentan diferencias estadísticamente significativas según el test ANOVA seguido del test de Tukey y el método no paramétrico de Wilcoxon ($P>0,05$). Valores con el mismo número en cada fila no presentan diferencias estadísticamente significativas según el test de Tukey y el método no paramétrico de Wilcoxon ($P>0,05$).

Correlación entre capacidad antioxidante y contenido de PFT y entre capacidades antioxidantes

Los resultados obtenidos del Coeficiente de correlación de Pearson (R^2) para la comparación de CAOX (DPPH y FRAP) v/s Contenido fenólico y entre los distintos métodos de CAOX se presentan en la Tabla N°8:

Tabla N°8: Coeficiente de Pearson (R^2) obtenido para las distintas comparaciones.

Parámetro	Extracto Acuoso	Extracto Hidroalcohólico
DPPH v/s PFT	0,7089	0,9538
FRAP v/s PFT	0,8335	0,8182
DPPH v/s FRAP	0,7089	0,9538

DISCUSIÓN

Recolección y secado

En la tabla N°4 se observa el resultado del proceso de secado de las hojas de matico por liofilización. En el proceso total se obtuvo un $29,9\pm 1,0\%$ de rendimiento de material seco (163,94 g) con una pérdida de agua de $70,1\pm 1,1\%$. Las diferencias presentadas en el porcentaje de pérdida de agua para los distintos grupos de trabajo no presentan significancias entre sí ($P>0,05$).

El contenido de agua en drogas vegetales frescas varía entre un 60 y 80%. El proceso de secado debe reducir este contenido a 0,5-12%. El secado del material vegetal tiene una importancia fundamental para la conservación por períodos prolongados de las características físicas, químicas y farmacológicas del vegetal, puesto que al ser removidos de sus condiciones naturales, su equilibrio metabólico se altera promoviendo reacciones que producen pérdida de principios activos por procesos tales como hidrólisis de compuestos activos, descomposición enzimática, fotodegradación de compuestos susceptibles, volatilización y contaminación por hongos y/o bacterias (Sharapin, 2000).

Al descender la cantidad de agua las enzimas detienen su actividad, quedando inhibidas e interrumpiendo los procesos de degradación, impidiendo así el crecimiento de microorganismos y las reacciones de oxidación e hidrólisis, para

finalmente conservar la planta y/o sus partes en condiciones óptimas (Sharapin, 2000; Álvarez y Martínez, 2004; Osorio, 2009).

La liofilización es el proceso que más efectivo en reducir la cantidad de agua libre contenida en los vegetales pasando esta directamente de sólido a vapor por sublimación. Tiene como ventaja el reducir el riesgo de degradación de los compuestos termolábiles al no exponer el material vegetal a condiciones de calor, preservando la estructura molecular de la planta. A pesar de ser una técnica costosa y lenta, otorga una mayor calidad al producto final (Osorio, 2009).

Determinación de PFT

El contenido fenólico de los extractos acuoso e hidroalcohólico fue cuantificado utilizando el método de Folin- Ciocalteu (Folin y Ciocalteu, 1927) descrito por ISO 14502-1 (2005) y su contenido se expresó como mg GAE/100 g de muestra en b.s.

Se realizó un control de material vegetal sin tratamiento de radiación (C₅: grupo control sin tratamiento y 5 días de incubación) en las condiciones descritas anteriormente (20°C y 38-45% HR), incubado por 5 días en oscuridad con la finalidad de cuantificar el efecto del corte en la estimulación del metabolismo secundario de las hojas de matico, para así evaluar el aporte adicional al contenido fenólico total que produciría el efecto de la radiación UV-B. Se obtuvieron concentraciones de 101,8±4,8 mg GAE/100 g de muestra en b.s. para el extracto acuoso y 118,5±10,2 mg GAE/100 g de muestra en b.s. para el extracto

hidroalcohólico en el contenido fenólico. A pesar que se observa claramente un aumento en el contenido de fenoles con respecto al control C_0 (grupo control sin tratamiento y sin incubación), este no resulta ser significativo ($P>0,05$). Con esto podemos inferir que el mayor aporte al aumento del contenido fenólico estaría dado por la exposición de la hoja a radiación UV-B.

Aunque no es significativo, el aumento mostrado en el grupo control C_5 para ambos extractos (acuoso e hidroalcohólico), podría ser atribuido al estrés sufrido al momento de arrancar la hoja del árbol, lo cual estimularía su metabolismo secundario. Este mecanismo ha sido observado en otros estudios en donde de igual forma se ha registrado un aumento en el contenido de fenoles totales en frutas y vegetales incubados por períodos de hasta 8 días (Du y cols., 2012; Surjadinata y cols., 2012).

Estudios realizados por Bottino y cols. (2009) han encontrado que el contenido de fenoles totales en hojas frescas enteras y cortadas de espinacas es estable durante un tiempo de incubación de 7 días a 4°C , observándose un máximo en el contenido de estos a las 72 h (3 días) para la hoja entera, concluyendo además que los flavonoides más importantes en el vegetal no sufren cambios en el período de almacenamiento de hojas enteras, pudiendo incrementarse significativamente.

En los resultados obtenidos en este estudio se observó un aumento significativo ($P<0,05$) entre los grupos control C_0 y C_5 y los grupos irradiados R_5 (grupo con

tratamiento de 5 minutos e incubación de 5 días) y R₁₀ (grupo con tratamiento de 10 minutos e incubación de 5 días) en el contenido PFT para el extracto acuoso.

Con respecto al tratamiento R₁ (grupo con tratamiento de 1 minuto e incubación de 5 días) también se evidencia un aumento que no resulta ser estadísticamente significativo ($P>0,05$). Los porcentajes de aumento en el contenido de PFT corresponden a un 3, 9, 12 y 19% para C₅, R₁, R₅ y R₁₀ respectivamente, con respecto al grupo control C₀. Entre los grupos tratados con distintas dosis de radiación UV-B, se puede observar un aumento en el contenido de PFT en forma proporcional al incremento de la dosis, no siendo este incremento estadísticamente significativo ($P>0,05$).

Este patrón similar se observó en el extracto hidroalcohólico que presentó un aumento significativo ($P<0,05$) entre C₀ y C₅ y los grupos R₅ y R₁₀, los cuales fueron expuestos a radiación UV-B. La comparación de los controles con R₁ no resultó ser significativa ($P>0,05$). En relación al grupo control C₀, los porcentajes de incremento en el contenido de PFT corresponden a un 0, 10, 16 y 28% para C₅, R₁, R₅ y R₁₀ respectivamente. Para los grupos que recibieron distintas dosis de radiación, existe un aumento en el contenido de PFT con el incremento de la dosis recibida, siendo este aumento estadísticamente significativo ($P>0,05$) sólo para R₁₀.

De los resultados obtenidos se puede deducir que el tratamiento de exposición a radiación UV-B al que han sido sometidas las hojas de matico tiene un claro efecto

en el aumento del contenido de PFT. Este fenómeno ha sido ampliamente descrito por otros autores, en donde se ha visto el incremento de compuestos fenólicos en otros vegetales en respuesta al estrés biótico o abiótico a los que se somete el material vegetal (Dolzhenko y cols., 2010; Sales y col., 2010; Amodio y cols., 2014; Takshak y Agrawal, 2014).

Esta estimulación de la síntesis de metabolitos secundarios inducidos por radiación UV-B involucra cambios a nivel de la expresión génica, modulando la actividad enzimática, biosíntesis y acumulación de compuestos absorbedores de radiación en la epidermis de la hoja (Dolzhenko y cols., 2010; Amodio y cols., 2014), con lo que se previene o disminuye daño en proteínas, lípidos de membrana, degradación y cambios conformacionales en el ADN (formación de fotoproductos), alteraciones en la actividad fotosintética y crecimiento y morfología de las plantas (Hollósy, 2002; Jansen y cols., 2008; Dolzhenko y cols., 2010; Sales y col., 2010; Rai y cols., 2011; Du y cols., 2012). Estas respuestas son reguladas por vías de señalización distintas, ya sea en respuesta a bajas ($2-8 \text{ kJ/m}^2/\text{día}$) o altas dosis UV-B (sobre los $8 \text{ kJ/m}^2/\text{día}$) (Du y cols., 2012; Bandurska y cols., 2013).

La exposición a la radiación UV-B genera Especies Reactivas de Oxígeno (EROS) como resultado del trastorno metabólico y el deterioro del transporte electrónico fotosintético, que trae como consecuencia el incremento en la actividad de NADPH-oxidasa y peroxidasa localizadas en la membrana. Con bajas dosis de radiación UV-B el control de los niveles de EROS está regulado por vías de

señalización específicas que involucran a la proteína fotorreceptora UVR8 (UV Resistance Locus 8) localizada en el citoplasma, que se trasloca rápidamente hacia el núcleo para su activación e interacción con ubiquitina ligasa E3 COP1 (Constitutively Photomorphogenic 1). El complejo UVR8/COP1 desencadena la expresión de genes que codifican los factores de transcripción HY5 (Elongated Hypocotyl 5) y HYH (HY5 Homolog), los cuales son efectores “downstream” en respuesta al bajo flujo de radiación UV-B activando la expresión de genes que codifican enzimas involucradas en la biosíntesis de flavonoides y la defensa antioxidante (Bandurska y cols., 2013; Jenkins, 2014).

Cuando las condiciones son de alta radiación UV-B, este sistema se ve sobrepasado generando la sobreproducción de EROS, con el inminente daño a ADN, proteínas y a la integridad del aparato fotosintético vegetal. La respuesta de la planta es regulada en estos casos por vías UVR8-dependientes y HY5/HYH-independientes, que corresponden a la expresión de genes que no son específicos para UV-B pero si para estrés general (Bandurska y cols., 2013).

Esta respuesta envuelve la activación de MAPKs (Mitogen-Activated Protein Kinases) UVR8-independiente que se han reportado en trabajos realizados en *Arabidopsis thaliana* como reguladores positivos de daño celular inducido por UV-B. El aumento de EROS en estas condiciones también estimula la síntesis de los ácidos salicílico, jasmónico y etileno, los cuales activan vías de respuesta de la planta en defensa a UV-B o vías de transducción de señales para estrés general,

iniciando la “up-regulation” de proteínas relacionadas a patogénesis y genes ligados a senescencia (Bandurska y cols., 2013).

Entre las distintas dosis de radiación UV-B a las que fueron expuestos los distintos grupos existe un aumento del contenido de polifenoles totales que, aunque no es significativo en todos los casos con respecto a los grupos control ($P > 0,05$), es proporcional al aumento de la dosis acumulada según el tiempo total de exposición a la radiación. Similares resultados describe Hollósý (2002) en experimentos realizados en cultivos de callos de *Lysimachia* en el que, ante la exposición continua a radiación UV-A o UV-B, el cultivo empieza a producir flavonoides de manera tiempo-dependiente, alcanzando su máximo a las 72 horas de exposición, posteriormente la re-adición de UV-B o UV-A resulta en pequeños incrementos en el contenido de flavonoides.

Estudios realizados por Martínez y cols. (2014) evidencian un incremento cuantitativo en el contenido de flavonoles y cualitativo en el contenido de antocianinas en piel de uvas como producto de la exposición a dosis de 5,98 $\text{kJ/m}^2/\text{d}$ y 9,66 $\text{kJ/m}^2/\text{d}$ de radiación UV-B con tiempos de exposición de 3 h y 4,85 h respectivamente. Se encontró además una correlación positiva entre el aumento de la dosis de radiación UV-B y el incremento de flavonoles trisustituidos y antocianinas.

La implicancia de los flavonoides en la respuesta a la radiación UV-B ha sido informada por distintos investigadores y en variadas especies de plantas (Liu y

cols., 1995; Cassi-Lit y cols., 1997; Casati y Walbot, 2003). Estos compuestos son absorbedores de radiación UV-B, acumulándose en vacuolas preferentemente de la epidermis atenuando la penetración de la radiación a capas de células más profundas sin interferir con la absorción PAR (Cadwell y cols., 1983; Carrasco, 2009; Dolzhenko y cols., 2010; Du y cols., 2012; Amodio y cols., 2014; Martínez y cols., 2014).

El método para la cuantificación del contenido de polifenoles totales es ampliamente utilizado, pero es inespecífico debido a la reacción de reducción que puede ocurrir del complejo de ácido fosfotúngstico-fosfomolibdico ante la presencia de tirosina y triptófano de otros compuestos no fenólicos en ambiente alcalino, cuya estructura también presenta anillos bencénicos (Folin y Ciocalteu, 1927). A pesar de este hecho, este valor no se debe despreciar aunque no sea absoluto, ya que puede ser una buena aproximación del contenido real de la muestra y un indicador de la capacidad antioxidante de esta (Bruneton, 2001).

Determinación de Capacidad Antioxidante

- **FRAP**: Al utilizar el método FRAP no se encontraron diferencias significativas ($P > 0,05$) entre los grupos C_0 y C_5 en los extractos acuoso e hidroalcohólico.

Al comparar los grupos control C_0 y C_5 con aquellos que recibieron distintas dosis de radiación UV-B, se observa que el extracto acuoso no muestra diferencias significativas con el grupo R_1 ($P > 0,05$), si encontrándose significancias ($P < 0,05$) con los grupos R_5 y R_{10} . Para el extracto hidroalcohólico se encontraron

diferencias entre el grupo control C_0 y todos los grupos irradiados con UV-B (R_1 , R_5 , R_{10}) ($P < 0,05$) y para el grupo C_5 sólo con R_{10} ($P < 0,05$), no presentando diferencias con los grupos R_1 y R_5 ($P > 0,05$). En la comparación de los grupos que fueron expuestos a las distintas dosis de radiación UV-B no se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre R_1 y R_5 ; y entre la comparación de los grupos R_5 y R_{10} para el extracto acuoso ($P > 0,05$); entre los grupos R_1 y R_{10} existen diferencias significativas en la capacidad antioxidante evaluada con el método FRAP ($P < 0,05$).

En el extracto hidroalcohólico no se observan diferencias entre los grupos R_1 y R_5 ($P > 0,05$) pero si entre estos dos grupos con R_{10} ($P < 0,05$).

El aumento de los valores de CAOX con respecto al grupo control C_0 es de 0, 1, 11 y 18% para el extracto acuoso y de 9, 6, 15 y 31% para el extracto hidroalcohólico los cuales corresponden a los grupos C_5 , R_1 , R_5 y R_{10} respectivamente.

En comparación con resultados obtenidos por Wong y cols. (2006) al evaluar capacidad antioxidante a través del método FRAP en plantas no expuestas a radiación UV-B típicas de la medicina tradicional china, se obtienen valores más altos en CAOX para los extractos acuosos usando el mismo protocolo de obtención de extractos. Para el extracto hidroalcohólico también se obtienen mejores resultados, sin embargo, el protocolo de extracción de los compuestos difiere en condiciones tales como la mezcla de solventes utilizada

(metanol:agua=8:2), temperatura (40°C) y tiempo de extracción (24 h), estos parámetros podrían interferir en el rendimiento de compuestos obtenidos.

En los resultados obtenidos para los grupos tratados con distintas dosis de radiación UV-B, se evidencia un incremento en la capacidad antioxidante en respuesta al aumento de la dosis utilizada. Similares resultados han encontrado Alothman y cols. (2009) quienes han reportado un aumento en valores de capacidad antioxidante evaluadas con el método FRAP en forma proporcional al aumento del tiempo de exposición a radiación UV-C (0,10, 20 y 30 m) en frutos como piña, plátanos y guava.

La metodología FRAP fue desarrollado inicialmente para medir la habilidad reductora del plasma, empleando un método colorimétrico ligado a una reacción de óxido-reducción (Redox), en donde el compuesto que es reducido (Fe^{+3}) se encuentra en exceso, por lo que el factor limitante de la reacción es la habilidad reductora de la muestra (Benzie y Strain, 1996), este ha sido adaptado para su uso en la medición de capacidad antioxidante en plantas y alimentos (Prior y cols., 2005).

Este método tiene la característica de ser indirecto, ya que mide la aparición de un nuevo compuesto coloreado. Así, cuanto más antioxidante es la sustancia objeto de estudio, mayor es la reducción de Fe^{+3} , mayor la concentración de Fe^{+2} y más alta la señal de absorbancia obtenida (Agudo, 2010).

La técnica FRAP detecta compuestos con potenciales redox $< 0,7$ V (el potencial redox de $\text{Fe}^{+3}/\text{Fe}^{+2}$), por lo que este método puede ser un buen ensayo para medir la habilidad de compuestos de mantener el estado redox en células o tejidos (Prior y cols., 2005).

Para favorecer la reducción del complejo Fe^{+3} -TPTZ y la formación de color los antioxidantes deben actuar bajo las condiciones de reacción dadas (pH: 3,6; temperatura: 37°C) para así mantener la solubilidad del hierro en el sistema (Prior y cols., 2005; Agudo, 2010); la velocidad de formación de productos debe ser suficientemente rápida para que la reacción pueda ser completada en un ensayo de tiempo corto (Ou y cols., 2002) y el antioxidante oxidado y otros productos de reacción secundarios no deben generar interferencias en la absorción de Fe^{+2} -TPTZ a 593 nm (Ou y cols., 2002).

Las condiciones que se requieren son difíciles de obtener ya que cualquier compuesto con un potencial menor a $0,77$ V, no solo los polifenoles, podría reducir el Fe^{+3} y conducir a resultados falsamente elevados de FRAP (Ou y cols., 2002); además no todos los antioxidantes reducen Fe^{+3} a una alta velocidad, algunos compuestos fenólicos reaccionan más lentamente y por lo tanto el poder reductor no puede ser correctamente medido (Pulido y cols., 2000; Wright y cols., 2001; Ou y cols., 2002; Prior y cols., 2005). Pulido y cols. (2000) examinaron polifenoles de la dieta en medio acuoso y metanólico, encontrando que sustancias como los ácido cafeico, tánico, ferúlico, ascórbico y quercetina, reaccionaban lentamente, incrementando su absorbancia inclusive después de horas de reacción.

El mecanismo de reacción del ensayo FRAP corresponde al tipo SET (Single Electron Transfer) el cual mide la habilidad de un potencial antioxidante de transferir un electrón para reducir otro compuesto, como se observa en la Figura N°3:

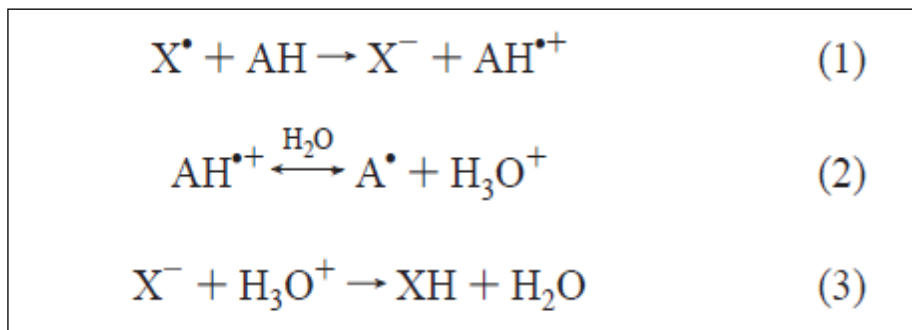


Figura N°3: Mecanismo de reacción SET (Prior y cols., 2005). (1) Transferencia de electrones; (2) desprotonación del radical catión y (3) formación del hidroperóxido.

La reactividad del mecanismo SET está basada en la desprotonación y el potencial de ionización (IP) del grupo funcional reactivo, por tanto las reacciones de este tipo son dependientes del pH, donde los valores de IP decrecen a bajos valores de pH lo que incentiva la transferencia de electrones y aumenta el potencial redox, reflejando una mayor capacidad donadora de electrones con la desprotonación. Estas reacciones son usualmente lentas y requieren largos tiempos para llevarse a cabo (Prior y cols., 2005).

- **DPPH:** Para esta prueba los resultados en el extracto acuoso muestran una diferencia significativa en el aumento de CAOX entre el grupo C_0 y todos los grupos que fueron expuestos a radiación UV-B (R_1 , R_5 , R_{10}) ($P < 0,05$) y también de C_0 con respecto al grupo C_5 ($P < 0,05$). Se observa la misma tendencia para el extracto hidroalcohólico entre el grupo control C_0 y los grupos irradiados con distintas dosis de UV-B (R_1 , R_5 , R_{10}) en los que el aumento de CAOX es significativo para los grupos estudiados ($P < 0,05$). No sucede esto al comparar el grupo control C_5 , el que presenta un aumento en CAOX que no es significativo con respecto a C_0 ($P > 0,05$).

En la comparación entre los grupos que recibieron un tratamiento de radiación UV-B no existen diferencias significativas ($P > 0,05$) entre R_1 y R_5 , pero sí de estos dos grupos con R_{10} en ambos tipos de extractos ($P < 0,05$).

El porcentaje de incremento de la capacidad antioxidante para el ensayo DPPH representa un 11, 13, 15 y 59% para C_5 , R_1 , R_5 y R_{10} respectivamente en el extracto acuoso y para el extracto hidroalcohólico corresponde a un 3, 15, 18 y 31% para C_5 , R_1 , R_5 y R_{10} respectivamente en comparación con el grupo control C_0 .

El aumento en los valores de CAOX para todos los grupos en relación al control C_0 , ha sido descrito en forma similar por otros autores como por ejemplo Du y cols. (2012) que observa un aumento en la capacidad antioxidante evaluados con esta técnica en zanahorias expuestas a radiación UV-B después de un período de incubación de 3 días a 15°C.

La decoloración del radical DPPH es una técnica de determinación directa en la cual el radical previamente formado produce una señal analítica. La adición del antioxidante, provoca una disminución de la señal debido a la disminución de la concentración del radical que está siendo apagado o inactivado producto de la acción del compuesto con propiedades antioxidantes (Agudo, 2010).

El radical DPPH es caracterizado como estable ya que presenta un electrón desapareado el cual se deslocaliza sobre la molécula completa por resonancia, posee un intenso color violeta con una fuerte banda de absorción alrededor de 517 nm, que desaparece cuando una sustancia puede donar un H^+ o electrón para reducirlo (Kedare y Singh, 2011).

Este no necesita ser formado previamente y es el único en reaccionar con la muestra en mezclas metanol/agua, solventes acuosos y orgánicos no polares, pese a ser soluble sólo en solventes orgánicos, lo que facilita la extracción una gama más amplia de antioxidantes, además el análisis de la capacidad antioxidante por otros métodos puede estar limitada a aquellos compuestos solubles en disolventes seleccionados (Kedare y Singh, 2011).

Puede ser usado en sistemas donde los antioxidantes débiles reaccionan en forma lenta y también para evaluar antioxidantes hidrofílicos y lipofílicos. Las condiciones de temperatura en que se realiza el ensayo disminuye el riesgo de degradación térmica de las moléculas estudiadas. Es un método considerado rápido, fácil de implementar, económico y ampliamente usado para evaluar la actividad

atrapadora a través del radical y la capacidad antioxidante total en una amplia variedad de vegetales y alimentos (Kedare y Singh, 2011).

También este método posee limitaciones tales como la interferencia de otros compuestos que pudieran existir en la muestra como los carotenoides, ya que absorben en el mismo rango de longitud de onda (Prior y cols., 2005). También existen otros inconvenientes como la inestabilidad del radical por sensibilidad a la luz, al oxígeno y al pH, los cuales hacen que se degrade rápidamente y sobreestime los resultados generando falsos positivos en las mediciones. El impedimento estérico también es una limitante de la reacción para la estructura del antioxidante, ya que pequeñas moléculas pueden tener mejor acceso al sitio radical y tendrán aparentemente más capacidad antioxidante en este ensayo, así como moléculas de mayor tamaño verán su capacidad antioxidante subvalorada (Prior y cols., 2005; Sharma y cols., 2009; Kedare y Singh, 2011). Al ser es soluble en solventes orgánicos (etanol, metanol), algunos de los compuestos presentes en la mezcla de reacción con carácter hidrofílico no lograrían su mayor actividad (Prior y cols., 2005; Sharma y cols., 2009).

Se debe tener en cuenta que el rango de exactitud de las mediciones realizadas con este ensayo es estrecho para las mediciones espectrofotométricas por lo que este debe ser determinado antes del ensayo (Sharma y cols., 2009),

DPPH es comúnmente clasificado como una reacción con un mecanismo tipo SET, pero también este radical puede ser neutralizado ya sea por reducción directa a

través de transferencia de electrones o por neutralización de las moléculas radicales a través de la donación de H^+ (HAT: Hidrogen Atom Transfer) (Prior y cols., 2005).

Este segundo tipo de mecanismo de la reacción denominado HAT mide la habilidad de inactivar radicales libres por donación de H^+ , en donde AH es cualquier donador de H^+ , como se aprecia en la figura N°4:

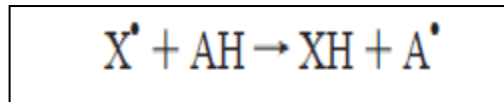


Figura N°4: Mecanismo de reacción HAT (Prior y cols., 2005).

Este tipo de reacciones son independientes del pH y del solvente utilizado y son usualmente rápidas, completándose en segundos a minutos.

Las características ideales que deben reunir los métodos para medir capacidad antioxidante son: sencillez, rapidez, mecanismo químico definido y punto final fijo, reproducibilidad, adaptabilidad a sustancias antioxidantes hidrofílicas y lipofílicas, no implicar un costo elevado de implementación, instrumentación de fácil acceso y un elevado rendimiento del análisis (Prior y cols., 2005; Mosquera y cols., 2007; Agudo, 2010, Kedare y Singh, 2011).

Las diferencias entre los ensayos utilizados en este estudio pueden ser atribuidas principalmente a estos factores y condiciones que caracterizan los métodos para la determinación de la capacidad antioxidante. Además, los antioxidantes para ejercer su acción de forma óptima, son dependientes de la polaridad del medio,

temperatura, tipo de sustrato, condiciones de oxidación, estado físico del sistema y la presencia de otros compuestos que puedan tener interacciones con las moléculas estudiadas (Prior y cols., 2005; Agudo, 2010).

Para estos dos métodos ambos mecanismos pueden ocurrir simultáneamente, pero el mecanismo dominante en el sistema será dado principalmente por la estructura del antioxidante y sus propiedades, la solubilidad, coeficiente de partición y solvente (Prior y cols., 2005).

Las propiedades antioxidantes intrínsecas que provee un compuesto fenólico se originan en su capacidad para ceder un protón o electrón. Los compuestos fenólicos tienen la habilidad de inactivar radicales ya que contienen grupos hidroxilos en su estructura, los cuales pueden donar protones o electrones a los radicales, transformándose ellos a su vez en radicales fenoxi más estables que el radical inicial (Aksoy y cols., 2013).

En los compuestos fenólicos, la Entalpía de Disociación de Enlace (Bond Dissociation Entalpy: BDE) y el potencial de ionización (IP) son los principales factores que determinarán el mecanismo y la eficacia antioxidante. La influencia de BDE en la eficacia del antioxidante está dada según la fuerza del enlace O-H, si este es más débil (menor BDE), más rápida será su reacción con los radicales libres (Wright y cols., 2001; Hoelz y cols., 2010). El potencial de ionización es definido como la energía mínima requerida para remover un electrón de una molécula pura o átomo en fase gaseosa, cuando este parámetro disminuye en

función del aumento de pH, el antioxidante cede el electrón formándose un radical catiónico como se observa en la ecuación (1) de la Fig. N°3, generándose luego una rápida desprotonación reversible en solución formándose un hidroperóxido (ver ecuación (2) y (3) de la Fig. N°3), siendo este parámetro fuertemente dependiente del pH (Wright y cols., 2001; Prior y cols., 2005; Hoelz y cols., 2010).

Para los extractos obtenidos se observa claramente un rendimiento significativamente mayor ($P < 0,05$) en la extracción hidroalcohólica para todos los análisis realizados (PFT, FRAP, DPPH), esto podría sugerir según Bruneton (2001) que en el extracto hidroalcohólico podría haber un mayor contenido de compuestos como por ejemplo flavonoides con mayor afinidad por la mezcla hidroalcohólica, que cumplirían un rol protector antioxidante en plantas (McClure, 1975; Pourcel y cols., 2006; Falcone y cols., 2012).

Correlación entre capacidad antioxidante y contenido de PFT y entre Capacidades Antioxidantes

La correlación, también denominada Capacidad Antioxidante Específica (CAOX específica), corresponde a la razón entre la capacidad antioxidante y los fenoles totales solubles. Este parámetro se utiliza para determinar la contribución de los polifenoles presentes en la muestra a la capacidad antioxidante de esta por medio de la obtención del Coeficiente de correlación de Pearson (R^2), estimando la capacidad para inhibir o neutralizar EROS de la mezcla fenólica (Jacobo-Velázquez y Cisneros-Zevallos, 2009).

Los resultados obtenidos para CAOX específica se resumen en la Tabla N°8, en la cual se observan las comparaciones realizadas entre los análisis para medir capacidad antioxidante (DPPH y FRAP) v/s contenido de fenoles totales (PFT) y entre los dos ensayos de capacidad antioxidante (DPPH v/s FRAP) realizados para los dos extractos obtenidos (acuoso e hidroalcohólico).

En la correlación de DPPH v/s PFT (% Inhibición DPPH/mg GAE), se obtuvo para el extracto acuoso un valor de R^2 correspondiente a 0,7089 y para el extracto hidroalcohólico el valor obtenido fue de 0,9538. Ambos resultados muestran claramente que el aumento de la intensidad del estrés inducido por la radiación UV-B estimularía la síntesis de compuestos fenólicos que aportarían a la defensa antioxidante de la planta. En este caso, la mejor correlación obtenida es la correspondiente al solvente metanol:agua (70:30), en donde la extracción de compuestos fenólicos podría estar generando una mezcla más eficiente en la inhibición de EROS.

En la correlación para FRAP v/s PFT (moles FeSO_4 /mg GAE), el R^2 obtenido para el extracto acuoso corresponde a 0,8335 y para el extracto hidroalcohólico se obtuvo un R^2 de 0,8182. Estos valores indican que existe un aumento en el contenido de fenoles que se relaciona con el aumento de la capacidad reductora que evalúa este método para ambos extractos. No existe una diferencia importante en la comparación de los R^2 entre los dos tipos de extractos, con esto podemos deducir que los polifenoles extraídos por la mezcla metanol:agua (70:30) no aportan significativamente al aumento de las propiedades reductoras de la

mezcla dadas por los compuestos fenólicos solubles en el extracto acuoso, siendo estos últimos los mayores contributores a la capacidad reductora de la muestra.

Se encuentran altos coeficientes de correlación en los valores de DPPH v/s FRAP, sin embargo estos son idénticos a los obtenidos en la correlación de DPPH v/s PFT en ambos extractos. Esto podría ser explicado a través del análisis de las pendientes obtenidas por medio de la ecuación de la recta de las gráficas DPPH v/s PFT y FRAP v/s PFT para ambos extractos (ver Anexo N°5, 6 y 7). En ambos extractos los valores de las pendientes obtenidas para DPPH son elevadas (4,08 y 3,27 para el extracto acuoso e hidroalcohólico respectivamente), esto quiere decir que el pequeño incremento en el contenido de fenoles en respuesta a la radiación UV-B, produce la síntesis de compuestos fenólicos con mecanismo principalmente donador de H^+ .

En la gráfica FRAP v/s PFT las pendientes obtenidas corresponden a 0,079 y 0,147 para los extractos acuoso e hidroalcohólico respectivamente, esto quiere decir que la mezcla de compuestos fenólicos con capacidad reductora (mecanismo SET) no es alta y no implica un aporte importante o significativo a la eficiencia antioxidante del sistema, ya que su pendiente es pequeña en comparación con la correspondiente al ensayo DPPH. Con esta observación, y a pesar de que ambos mecanismos coexisten en la mezcla fenólica, se podría decir que el mecanismo predominante se basaría principalmente en reacciones tipo HAT (Hydrogen Atom Transfer).

Un vegetal con un mayor contenido de compuestos fenólicos totales podría presentar una mayor actividad antioxidante, sin embargo esto no siempre ocurre. La capacidad antioxidante de una planta no sólo se debe al aumento de compuestos fenólicos, sino a otros factores tanto cuali como cuantitativos, como puede ser la presencia de otro tipo de metabolitos antioxidantes no fenólicos, una actividad pro-oxidativa que se contrapone al potencial antioxidante y la presencia de una mezcla no adecuada de compuestos fenólicos (Gutiérrez, 2008; Jacobo-Velázquez y Cisneros-Zevallos, 2009; Shen y cols., 2013).

No se han encontrado en la literatura otros estudios que apoyen o complementen los resultados obtenidos en cuanto al efecto de la radiación UV u otro tipo de estrés en la estimulación de la biosíntesis de compuestos fenólicos para *Buddleja globosa* Hope.

Las publicaciones más recientes para esta planta dan cuenta de estudios realizados por Letelier y cols. (2008), en el cual se determinó el contenido de polifenoles totales e inhibición del radical DPPH en extractos hidroalcohólicos estandarizados (Extracto 1: 1 g de hojas rinde 3,8 mL de extracto, Densidad: 0,916 g/mL, Grado Alcohólico: 59° GL; Extracto 2: 1 g de hojas rinde 7,18 mL de extracto, Densidad: 0,935 g/mL, Grado Alcohólico: 50° GL), también se realizaron ensayos de peroxidación de lipídica microsomal, consumo de O₂ inducido por Cu⁺²/ascorbato y contenido de tioles microsomales. En otro estudio realizado se midió el perfil de seguridad vía oral para extractos hidroalcohólicos estandarizados (Letelier y cols., 2012).

Backhouse y cols. (2008b) realizaron estudios de actividad antioxidante con los métodos xantino-oxidasa y DPPH, peroxidación en eritrocitos y ensayos *in vivo* de actividad analgésica (Test de Writhing) y antiinflamatoria (edema inducido en oreja y pie) en extractos metanólicos matico y otros obtenidos por extracción secuencial con solventes de polaridad creciente (n-hexano, diclorometano (DCM) y metanol).

Otro estudio también realizado por Backhouse y cols. (2008a) caracterizó propiedades farmacológicas *in vivo* tales como analgesia (Test de Writhing, Ensayo Tail Flick vía oral y tópica, Test de la formalina y actividad antiinflamatoria tópica) para componentes de matico tales como verbascósido y 7-O-luteolin-glicosido, purificados desde extractos etanólicos y metanólicos respectivamente.

Un estudio realizado por Vogel y cols. (2010) evaluó el contenido fenólico, peroxidación de lípidos microsomales y contenido de tioles microsomales en extractos hidroalcohólicos estandarizados de hojas de matico de distintas procedencias con el fin de buscar diferencias en las propiedades antioxidantes. Además se evaluaron condiciones estacionales, estrés hídrico y secado de hojas y su efecto sobre estos parámetros.

La aplicación de radiación UV-B puede proporcionar importantes beneficios al mejorar las propiedades nutracéuticas de los alimentos y hierbas medicinales a los cuales se les aplica, ya que cumple un rol en los procesos metabólicos que estimulan la biosíntesis y aportan al incremento del contenido de compuestos bioactivos con propiedades benéficas tales como fenoles y flavonoides (Allothman

y cols., 2009; Castagna y cols., 2013). Esta nueva tecnología podría ser explotada en el procesamiento de alimentos a nivel industrial para el aumento de las propiedades saludables asociadas a estos.

Otras aplicaciones de esta tecnología tienen relación con la seguridad microbiana, afectando la tasa de crecimiento de microorganismos por daño directo a su material genético y alterando la composición química de la planta al estimular los mecanismos de defensa (como por ejemplo la síntesis de fitoalexinas), haciéndola más resistente al ataque de distintos patógenos y evitando la propagación de enfermedades transmitidas por alimentos en la población (Allothman y cols., 2009; Carrasco, 2009; Castagna y cols., 2013).

Además del efecto sobre la carga microbiana que podría ayudar a la inocuidad, también se inactivan enzimas relacionadas a procesos de maduración y senescencia, conservándose así durante más tiempo y retrasando o impidiendo que se produzcan condiciones no deseadas tales con el deterioro y el sabor y palatabilidad (Rivera-Pastrana y cols., 2007; Rossi y cols., 2009).

Según Cisneros-Zevallos (2003), hay una búsqueda en los consumidores de productos de calidad con altos niveles nutracéuticos para el beneficio de la salud. La radiación UV-B podría ser una buena alternativa tecnológica para garantizar el mantenimiento de la calidad en alimentos y hierbas medicinales, reduciendo los microorganismos potencialmente patógenos, prolongando su vida útil y aumentando

el contenido de compuestos beneficiosos (Du y cols., 2012), además de presentar un bajo costo y fácil aplicación (Rivera-Pastrana y cols., 2007).

Para una correcta aplicación de esta tecnología se hacen necesarios estudios más profundos de los beneficios que aporta versus potenciales efectos negativos que pudiese tener el uso de radiación UV-B en la generación de compuestos no deseados, esto con el fin de asegurar la inocuidad y la mantención de las características organolépticas y nutricionales deseadas evitando cambios en la calidad (Cisneros-Zevallos, 2003; Rossi y cols., 2009).

CONCLUSIONES

- La radiación UV-B aplicada a hojas frescas de *Buddleja globosa* Hope produce un aumento en el contenido de polifenoles totales y capacidad antioxidante, siendo este efecto proporcional al incremento de la dosis de radiación utilizada.
- Existe una correlación positiva entre el aumento en la capacidad antioxidante evaluada por DPPH y FRAP y el aumento del contenido fenólico total, indicando que el incremento en la intensidad de la radiación UV-B estimularía la síntesis de compuestos fenólicos que aportan a la defensa antioxidante de la planta.
- El análisis de la pendiente obtenida de las gráficas DPPH v/s PFT y FRAP v/s PFT determinan que la respuesta antioxidante de ambos extractos se debería principalmente a un mecanismo inhibidor de radicales libres a través de la donación de H⁺ (HAT).
- La exposición de las hojas de matico a radiación UV-B induciría cambios en la expresión génica, actividad enzimática, biosíntesis y acumulación de compuestos en la epidermis de la hoja, principalmente flavonoides. Se requieren más estudios para avalar estos mecanismos de respuesta.
- Se observó un rendimiento significativamente mayor ($P < 0,05$) en la extracción hidroalcohólica para todos los análisis realizados (PFT, FRAP, DPPH). Se

necesitan la realización de estudios para evaluar la influencia del solvente en la extracción de fenoles y en la capacidad antioxidante de las hojas de matico.

- La aplicación de radiación UV-B a hojas frescas de *Buddleja globosa* Hope podría ser considerada una alternativa tecnológica para la reducción de microorganismos patógenos, prolongar la vida útil de este producto y mejorar sus propiedades benéficas pudiendo extenderse esta aplicación a otras hierbas medicinales de uso tradicional. Se requieren estudios para reducir los posibles riesgos y mantener los beneficios que podría otorgar esta tecnología.

BIBLIOGRAFIA

Agudo, L. (2010): "Técnicas para la determinación de compuestos antioxidantes en alimentos". REDEX. 98: 27- 34.

Aksoy, L., Kolay, E., Ağilönü, Y., Aslan, Z., Kargioğlu, M. (2013): "Free radical scavenging activity, total phenolic content, total antioxidant status, and total oxidant status of endemic *Thermopsis turcica*". Saudi J Biol Sci. 20: 235-239.

Alothman, M., Bhat, R., Karim, A. (2009): "UV radiation- induced changes of antioxidant capacity of fresh-cut tropical fruits". IFSET. 10: 512- 516.

Álvarez, N., Martínez, J. (2004): "Algunos procedimientos para asegurar la calidad de los medicamentos herbarios" . BLACPMA. Vol. 3, 1: 4- 7.

Amodio, M., Derossi, A., Colelli, G. (2014): "Modeling phenolic content during storage of cut fruit and vegetables: A consecutive reaction mechanism". J. Food Eng. 140: 1- 8.

Avello, M., Cisternas, F. (2010): "Fitoterapia, sus orígenes, características y situación en Chile". Rev Med Chile. 138: 1288-1293.

Backhouse, N., Delporte, C., Apablaza, C, Farías, M., Goity, L., Arrau, S., Negrete, R., Castro, C., Miranda, H. (2008a): "Antinociceptive activity of *Buddleja globosa* (matico) in several models of pain". J Ethnopharmacol. 119: 160– 165.

Backhouse, N., Rosales, L., Apablaza, C., Goity, L., Erazo, S., Negrete, R., Theodoluz, C., Rodriguez, J., Delporte, C. (2008b): " Analgesic, anti-inflammatory and antioxidant properties of *Buddleja globosa*, Buddlejaceae". J Ethnopharmacol. 116: 263– 269.

Bandurska, H., Niedziela, J., Chadzinikolau, T. (2013): "Separate and combined responses to water deficit and UV-B radiation". Plant Sci. 213: 98-105.

Benzie, I., Strain, J. (1996): "The Ferric Reducing Ability of Plasma (FRAP) as a Measure of "Antioxidant Power": The FRAP Assay". Anal. Biochem. Vol. 239, 1: 70– 76.

Bottino, A., Degl'Innocenti, E., Guidi, L., Graziani, G., Fogliano, V. (2009): "Bioactive compounds during storage of fresh-cut spinach: the role of endogenous ascorbic acid in the improvement of product quality". J. Agric. Food Chem. 57: 2925- 2931.

Bravo, L. (1998): "Polyphenols: Chemistry, Dietary Sources, Metabolism, and Nutritional Significance". Nut. Rev. Vol. 56, 11: 317- 333.

Bruneton, J. (2001): "Farmacognosia. Fitoquímica. Plantas Medicinales". Editorial ACRIBIA S.A..Zaragoza. España.

Caasi-lit, M., Whitecross, M., Nayudu, M., Tanner, G. (1997): "UV-B radiation induces differential leaf damage, ultrastructural changes and accumulation of species phenolic compounds in rice cultivars". Aus J Plant Physiol. 24, 3: 261- 274.

Cadwell, M., Robberecht, R., Flint, S. (1983): "Internal filters: prospects for UV-acclimation in higher plants". *Physiol. Plant.* 58, 3: 445- 450.

Carrasco, L. (2009): "Efecto de la radiación Ultravioleta-B en plantas". IDESIA (Chile). Vol. 27, 3: 59-76.

Casati, P., Walbot, V. (2003): "Gene expression profiling in response to ultraviolet radiation in maize genotypes with varying flavonoid content". *Plant Physiol.* 132 , 4: 1739- 1754.

Castagna, A., Chiavaro, E., Dall'Asta, C., Rinaldi, M., Galaverna, G., Ranieri, A. (2013): "Effect of postharvest UV-B irradiation on nutraceutical quality and physical properties of tomato fruits". *Food Chem.* 137, 151-158.

Cisneros-Zevallos L. (2003): "The use of controlled postharvest abiotic stresses as a tool for enhancing the nutraceutical content and adding-value of fresh fruits and vegetables". *J Food Sci.* Vol. 68, 5: 1560–1565.

Charpentier A. (2013): "Efecto de la irradiación UV-C sobre el color, flora nativa y capacidad antioxidante del paico (*Chenopodium ambrosioides*) y de la ortiga (*Urtica dioica*) de la zona andina de Cotacachi". Tesis previo a la obtención del Título de Ingeniero de Alimentos. Universidad Tecnológica Equinoccial, Ecuador, Quito.

Chordi S. (2013): "Contenido fenólico y capacidad antioxidante de fresa mínimamente procesada sometida a tratamientos de conservación por pulsos de

luz de alta intensidad". Tesis para optar al grado en nutrición humana y dietética. Universidad de Lleida. Lleida.

Chung, K., Wong, T., Wei, C., Huang, Y., Lin, Y. (1998): "Tannins and Human Health: A Review". *Crit Rev Food Sci Nutr*. Vol. 38, 6: 421- 464.

Cushnie, T., Lamb, A. (2005): "Antimicrobial activity of flavonoids". *Int. J. Antimicrob. Agents*. 26: 343- 356.

Dixon, R., Paiva, N. (1995): "Stress-induced phenylpropanoid metabolism". *Plant Cell*, 7: 1085-1097.

Dolzhenko, Y., Berteau, M., Occhipinti, A., Bossi, S., Maffei, M. (2010): "UV-B modulates the interplay between terpenoids and flavonoids in peppermint (*Mentha piperita* L.)". *J Photochem. Photobiol. B: Biology* 100: 67– 75.

Du, W., Avena- Bustillos, R., Breksa, A., Mc Hugh, T. (2012): "Effect of UV-B light and different cutting styles on antioxidant enhancement of commercial fresh-cut carrot products". *Food Chem*. 134: 1862–1869.

Falcone, M., Rius, S., Casati, P. (2012): "Flavonoids: biosynthesis, biological functions, and biotechnological applications". *Front Plant Sci*. Vol. 3. 222: 1- 15.

Folin, O., Ciocalteu, V. (1927): "Determinations in proteins on tyrosine and tryptophane". *J. Biol. Chem.*, 73: 627- 650.

Gutiérrez, D., Ortiz, C., Mendoza, A. (2008): "Medición de Fenoles y Actividad Antioxidante en Malezas Usadas para Alimentación Animal". Simposio de Metrología. Universidad Autónoma de Querétaro, Querétaro, México.

Haminiuk, C., Maciel G., Plata-Oviedo, M., Peralta, R. (2012): "Phenolic compounds in fruits– an overview". Int J Food Sci Tech. Vol. 47, 10: 2023– 2044.

Hoelz, L., Horta, B., Araujo, J., Albuquerque, M., Bicca, R., Da Silva, J. (2010): "Quantitative structure-activity relationships of antioxidant phenolic compounds". J.Chem.Pharm.Res. 2, 5: 291- 306.

Hollósy, F. (2002): "Effects of ultraviolet radiation on plant cells". Micron 33:179-197.

Houghton, P. (2003): "*Buddleja globosa*: A medicinal plant of Chile, their chemistry, biological activity and traditional uses". BLACPMA. Vol. 2, 3: 36- 41.

Huang, Z., Wang, B., Eaves, D., Shikany, J., Pace, R. (2007): "Phenolic compound profile of selected vegetables frequently consumed by African Americans in the southeast United States". Food Chem. 103: 1395–1402.

ISO 14502-1 (2005): "Determination of substances characteristic of green and black tea. Part 1: Content of total polyphenols in tea. Colorimetric method using Folin-Ciocalteu reagent".

Jacobo-Velázquez, D., Cisneros-Zevallos, L. (2009): "Correlations of antioxidant activity against phenolic content revisited: A new approach in data analysis for food and medicinal plants". *J Food Sci*, Vol.74, 9: R107- R113.

Jansen, M., Hectors, K., O'Brien, N., Guisez, Y., Potters, G. (2008): "Plant stress and human health: do human consumers benefit from UV-B acclimated crops?". *Plant Sci*. 175: 449- 458.

Jenkins, G. (2014): "The UV-B photoreceptor UVR8: from structure to physiology". *The Plant Cell*. Vol. 26: 21 -37.

Kedare, S., Singh, R. (2011): "Genesis and development of DPPH method of antioxidant assay". *Food Technol*. 48, 4: 412- 422.

Letelier, M., Molina-Berríos, A., Córtes-Troncoso, J., Jara-Sandoval J., Holst, M., Palma, K., Montoya, M., Miranda, D., González-Lira, V. (2008): "DPPH and oxygen free radicals as pro-oxidant of biomolecules". *Toxicol. in Vitro*. 22: 279- 286.

Letelier, M., Jones, R., López, C., Palma, K., Aracena, P., Razmilic, I., Polanco, X., Vogel, H. (2012): "Safety profile and wound healing properties of a standardized *Buddleja globosa* Hope (matico) extract in sprague-dawley rats". *Rev. Farmacol. Chile*. 5, 1: 13- 19.

Liao, Y., Houghton, P., Houtt, J. (1999): "Novel and known constituents from *Buddleja* species and their activity against leukocyte eicosanoid generation". *J. Nat. Prod.*, 62: 1241- 1245.

Liu, L., Gitz, D., McClure, J. (1995): "Effects of UV-B on flavonoids, ferulic acid, growth, and photosynthesis in barley primary leaves". *Physiol Plant.* 93, 4: 725-733.

Martínez- Lüscher, J., Torres, N., Hilbert, G., Richard, T., Sánchez-Díaz, M., Delrot, S., Aguirreolea, J., Pascual, I., Gomès, E. (2014): "Ultraviolet- B radiation modifies the quantitative and qualitative profile of flavonoids and amino acids in grape berries". *Phytochem.* 102: 106- 114.

McClure, J. (1975): "The Flavonoids: Chapter 18: Physiology and functions of flavonoids". Springer Science+ Busines Media. Dordrecht.

Mensah, A., Sampson, J., Houghton, P., Hylands, P., Wesbrook, J., Dunn, M., Hughes, M., Cherry, G. (2001): "Effects of *Buddleja globosa* leaf and its constituents relevant to wound healing". *J Ethnopharmacol.* 77: 219- 226.

Meteorología de Chile (2015): www.meteochile.cl/climas/climas_quinta_region.html

MINSAL (2010): "MHT: Medicamentos Herbarios Tradicionales, 103 especies vegetales".

Mosquera, O., Correa, Y., Buitrago, D., Niño, J. (2007): "Antioxidant activity of twenty five plants from Colombian biodiversity". *Mem Inst Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, Vol 103, 5: 631- 634.*

Murcia, M., Parras, P., Jiménez, A., Vera, A., Martínez-Tomé, M., Ruggieri, S. (2003): "VII.Polifenoles y flavonoides: su importancia en la prevención de enfermedades". En: Pinto J. editor. "Nuevos alimentos para las nuevas necesidades". Servicio de Promoción de la Salud. Instituto de Salud Pública. Consejería de Sanidad. España.

Pardo, F., Perich, F., Villarroel, L., Torres, R. (1993): "Isolation of verbascoside, an antimicrobial constituent of *Buddleja globosa* leaves ". J Ethnopharmacol. 39:221-222.

ONEMI (2008): "Informe estadístico: Sistemas frontales año 2008". Región de Valparaíso.

Osorio, E. (2009): "Aspectos básicos de farmacognosia". Facultad de Química Farmacéutica. Universidad de Antioquia.

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.

Parada, M. (2012): "Legislación en Chile sobre fitofármacos y plantas medicinales". Rev. Farmacol. Chile. 5, 2: 7- 11.

Pourcel, L., Routaboul, J., Cheynier, V., Lepiniec, L., Debeaujon, I. (2006): "Flavonoid oxidation in plants: from biochemical properties to physiological functions". Trends Plant Sci. Vol.12, 1: 29- 36.

Prior, R., Wu, X., Schaich, K. (2005): "Standardized methods for the determination of antioxidant capacity and phenolics in foods and dietary supplements". J.Agric.Food Chem. 53: 4290- 4302.

Pulido, R., Bravo, L., Saura-Calixto, F. (2000): "Antioxidant activity of dietary polyphenols as determined by modified ferric reducing/antioxidant power assay". J.Agric.Food Chem. 48: 3396- 3402.

Rai, R., Prasad, R., Shuchi, S., Shukla, A., Kumar, S., Pandey-Rai, S. (2011): "UV-B and UV-C pre-treatments induce physiological changes and artemisinin biosynthesis in *Artemisia annua* L. – an antimalarial plant". J Photochem Photobiol. B: Biology 105: 216–225.

Rivera-Pastrana, D., Gardea, A., Martínez, M., Rivera- Domínguez, M., González-Aguilar, G. (2007): "Efectos bioquímicos post- cosecha de la irradiación UV-C en frutas y hortalizas". REV FITOTEC MEX, vol. 30, 4: 361- 372.

Rossi, L., Watson, D., Escandarini, S., Miranda, A., Troncoso, A. (2009): "La radiación a la mesa". Rev Chil Infect, 26, 4: 318- 330.

Sales, J., Resurrección, A. (2010): "Phenolic profile, antioxidants, and sensory acceptance of bioactive-enhanced peanuts using ultrasound and UV". *Food Chem.* 122: 795- 803.

Sepúlveda, G., Porta, H., Rocha, M. (2004): "La Participación de los Metabolitos Secundarios en la Defensa de las Plantas". *Rev. Mex. Fitopatol.* Vol. 21, 3: 355-363.

Sharapin, N. (2000): "Materias primas vegetales para la industria de productos fitofarmacéuticos" . *Revista de Fitoterapia.* 1, 3: 197- 203.

Sharma, O., Bhat, T. (2009): "DPPH antioxidant assay revisited". *Food Chem.* 113: 1202- 1205.

Shen, Y., Sun, Y., Qiao, L., Chen, J., Liu, D., Ye, X. (2013): "Effect of UV-C treatments on phenolic compounds and antioxidant capacity of minimally processed Satsuma mandarin during refrigerated storage". *Postharvest Biol Tech.* 76: 50–57.

Surjadinata, B., Cisneros-Zevallos, L. (2012): "Biosynthesis of phenolic antioxidants in carrot tissue increases with wounding intensity". *Food Chem* 134: 615– 624.

Takshak, S., Agrawal, S. (2014): "Secondary metabolites and phenylpropanoid pathway enzymes as influenced under supplemental ultraviolet-B Radiation in

Withania somnifera Dunal, an Indigenous Medicinal Plant". J Photochem Photobiol B: Biology. 140: 332- 343.

Vogel, H., Razmilic, I., Polanco, X., Letelier, M. (2010): "Effect of different provenances and production conditions on antioxidant properties in *Buddleja globosa* leaves". BLACPMA. 9, 5: 333 - 342.

Wilckens, P., Fernández, M.P., Gómez, M., Peña, I., Montenegro, G. (2013): "Sustainable management and use of a medicinal emblematic plant in Chile: *Buddleja globosa* Hope". PHYTON. 82: 81- 90.

Wollgast, J., Anklam, E. (2000): "Review on polyphenols in *Theobroma cacao*: changes in composition during the manufacture of chocolate and methodology for identification and quantification". Food Res. Int. 33: 423- 447.

Wong, C., Li, H., Cheng, K., Chen, F. (2006): "A systematic survey of antioxidant activity of 30 Chinese medicinal plants using the ferric reducing antioxidant power assay". Food Chem. 97: 705– 711.

Wright, J., Johnson, E., DiLabio, G. (2001): "Predicting the activity of phenolic antioxidants: theoretical method, analysis of substituent effects, and application to mayor families of antioxidants". J.Am.Chem.Soc. 123: 1173- 1183.

ANEXO 1



Figura N°5: Hojas de *Buddleja globosa* Hope.



Figura N°6: Inflorescencia de *Buddleja globosa* Hope.



Figura N°7: Árbol de Buddleja globosa Hope.

ANEXO 2

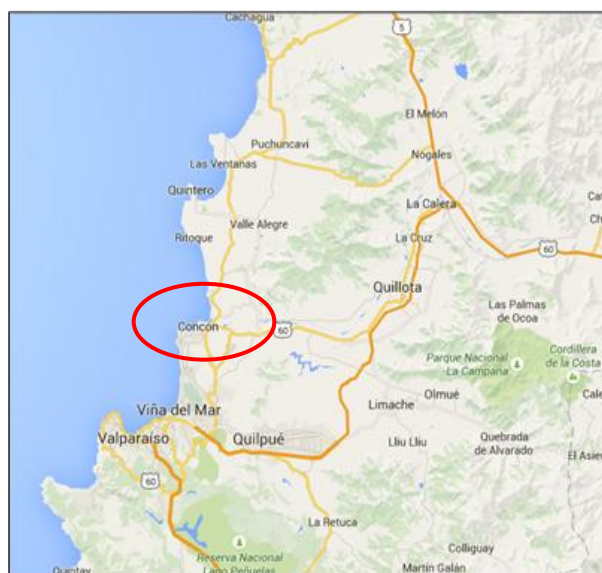


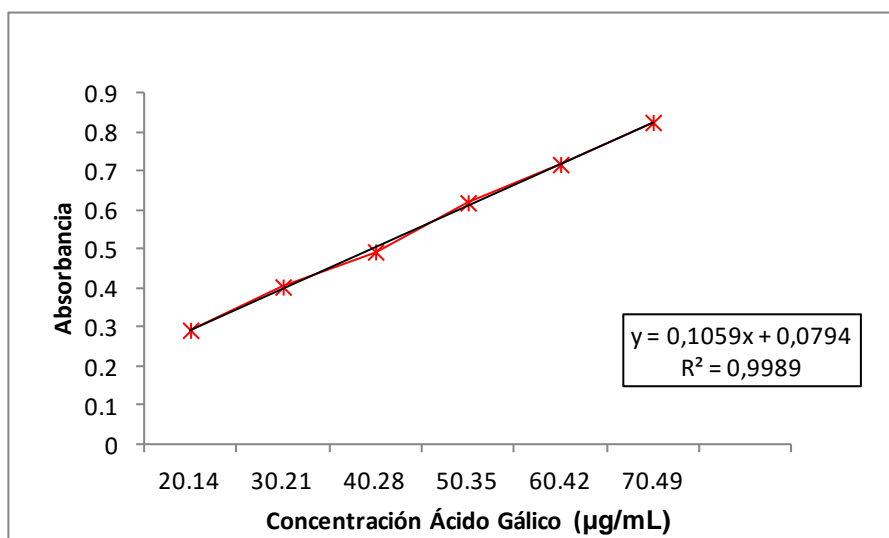
Figura N°8: Lugar geográfico de recolección de hojas de *B. globosa* Hope.

ANEXO 3

Curva de calibrado Ácido Gálico**Tabla N°9:** Concentración v/s Absorbancia para Acido Gálico.

(Concentración inicial: 1,007 mg/mL).

Punto	Concentración (µg/mL)	Absorbancia
1	20,14	0,293
2	30,21	0,404
3	40,28	0,494
4	50,35	0,620
5	60,42	0,718
6	70,49	0,826

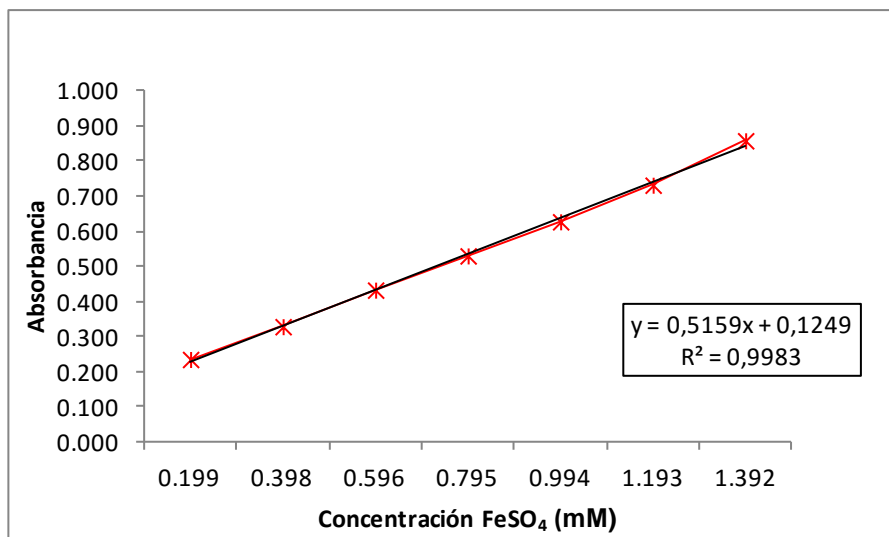
Gráfica N°1: Curva de calibrado Ácido Gálico.

ANEXO 4

Curva de calibrado FeSO₄.**Tabla N°10:** Concentración v/s Absorbancia para FeSO₄.

(Concentración inicial: 1,988 mM).

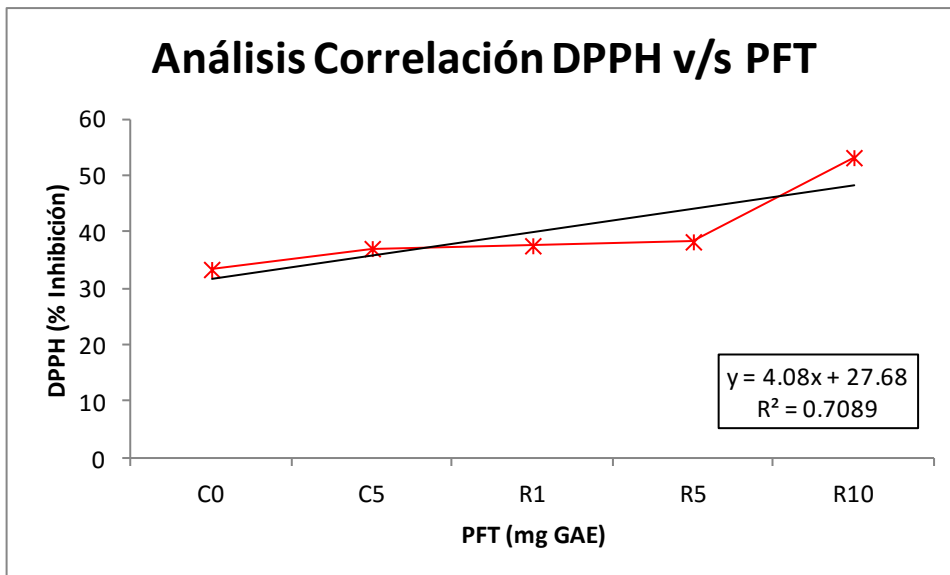
Punto	Concentración (mM)	Absorbancia
1	0,1988	0,235
2	0,3976	0,329
3	0,5964	0,433
4	0,7952	0,531
5	0,9940	0,628
6	1,1928	0,732
7	1,3916	0,859

Gráfica N°2: Curva de calibrado FeSO₄.

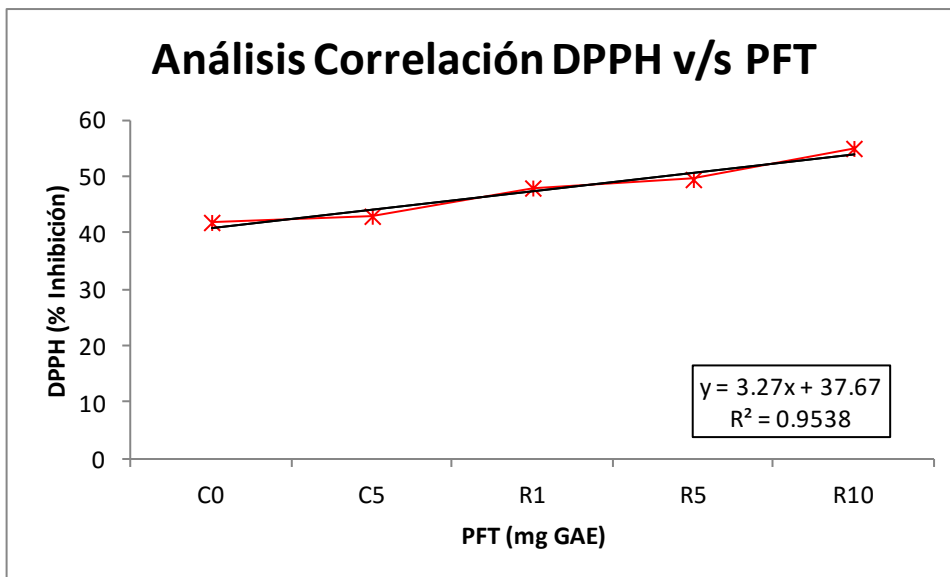
ANEXO 5

Análisis DPPH V/S PFT

Gráfica N°3: Análisis correlación DPPH v/s PFT para extracto acuoso.



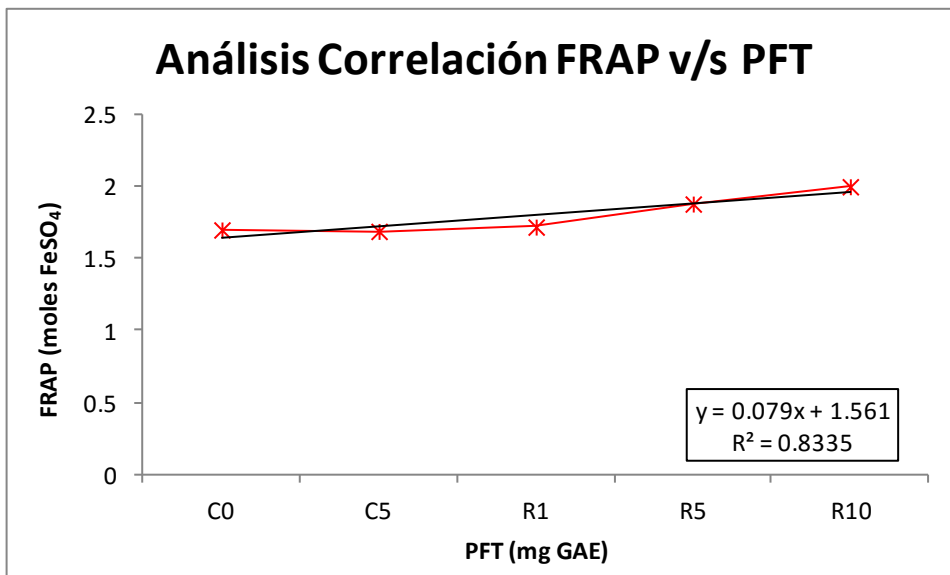
Gráfica N°4: Análisis correlación DPPH v/s PFT para extracto hidroalcohólico.



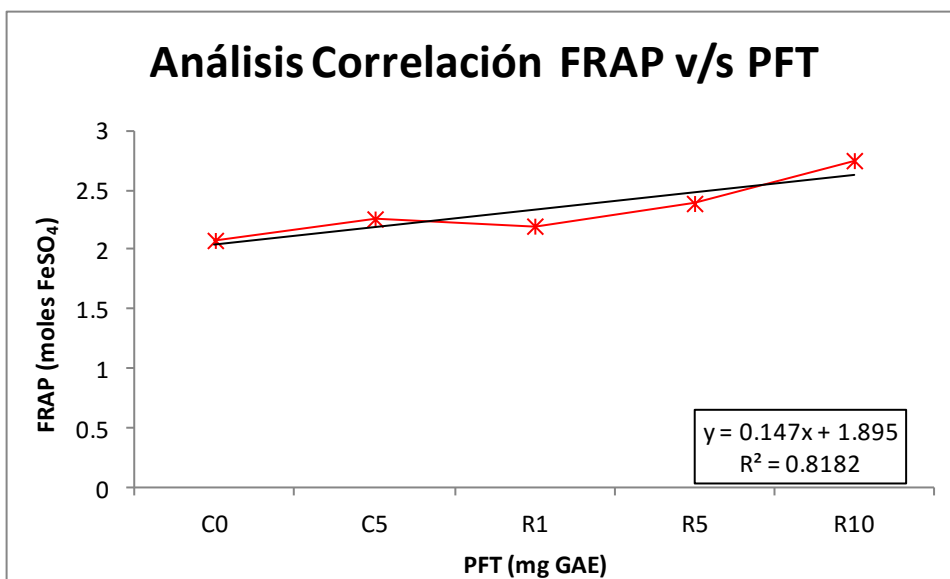
ANEXO 6

Análisis FRAP V/S PFT

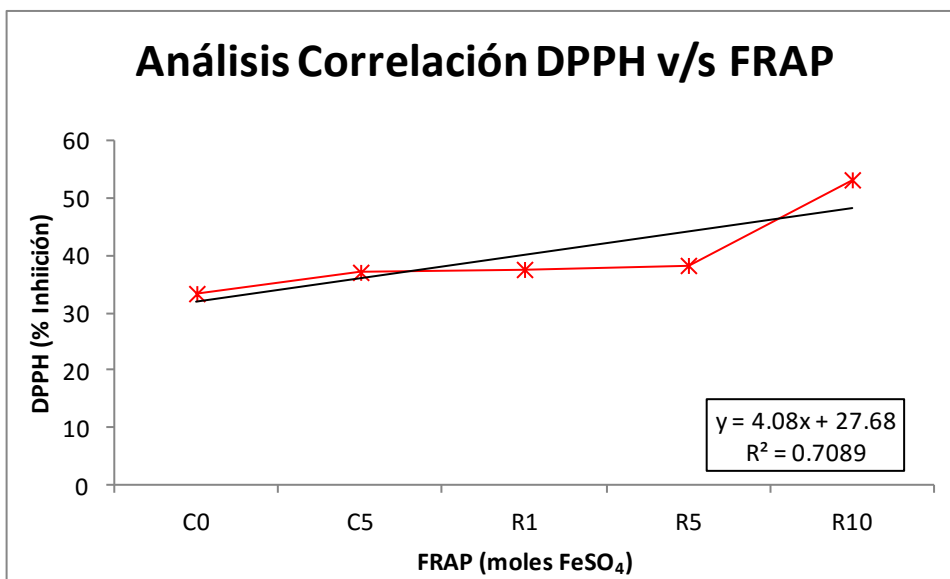
Gráfica N°5: Análisis correlación FRAP v/s PFT para extracto acuoso.



Gráfica N°6: Análisis correlación FRAP v/s PFT para extracto hidroalcohólico.



ANEXO 7

Análisis DPPH V/S FRAP**Gráfica N°7:** Análisis correlación DPPH v/s FRAP para extracto acuoso.**Gráfica N°8:** Análisis correlación DPPH v/s FRAP para extracto hidroalcohólico.