

UNIVERSIDAD DE CONCEPCIÓN

CAMPUS LOS ÁNGELES

Departamento de Ciencias y Tecnología Vegetal



Actividad antioxidante y antibacteriana
determinadas en extractos metanólicos obtenidos
desde partes aéreas de *Rhaphithamnus spinosus*
(Juss) Moldenke

MEMORIA DE TÍTULO PARA
OPTAR AL TÍTULO DE INGENIERO
EN BIOTECNOLOGÍA VEGETAL.

KATERINE ANGÉLICA VEGA BELMAR

LOS ÁNGELES - CHILE

2018

Actividad antioxidante y antibacteriana determinadas en extractos metanólicos obtenidos desde partes aéreas de *Rhaphithamnus spinosus* (Juss) Moldenke

Alumno



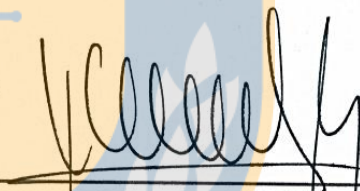
Katerine Angélica Vega Belmar
Ingeniero en Biotecnología Vegetal

Profesor Guía



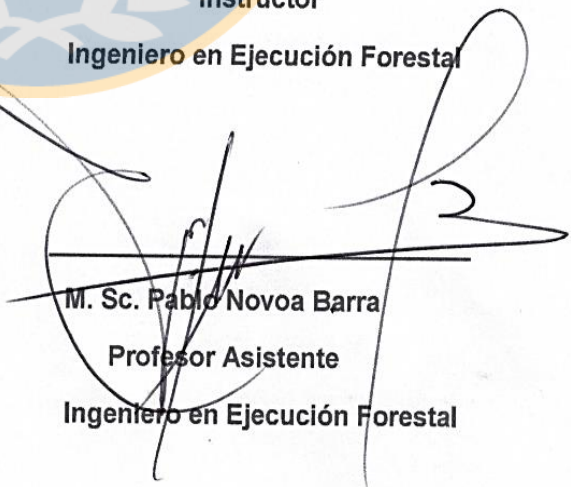
Dr. Carlos Schneider Barrera
Profesor Asociado
Químico Farmacéutico

Jefe de Carrera



Pedro Quiroz Hernández
Instructor
Ingeniero en Ejecución Forestal

Director Departamento



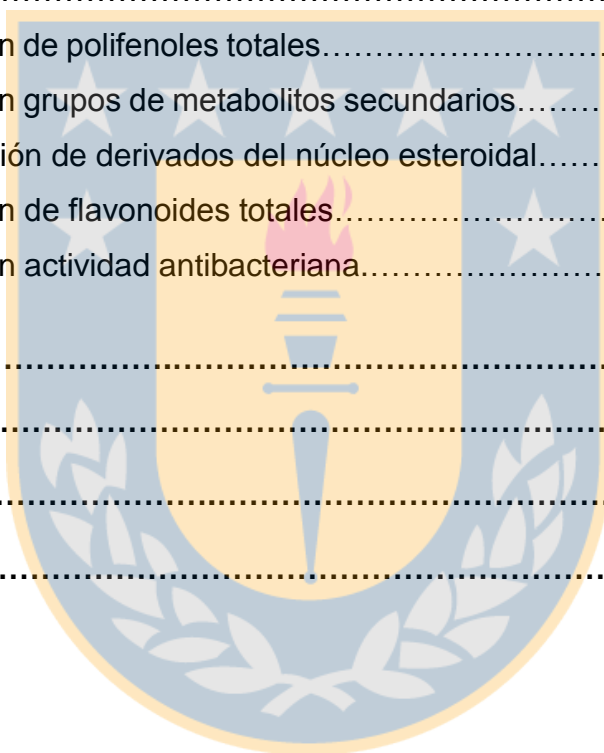
M. Sc. Pablo Novoa Barra
Profesor Asistente
Ingeniero en Ejecución Forestal

INDICE

RESUMEN	5
ABSTRACT	6
NOMENCLATURA Y ABREVIACIONES	7
1.-INTRODUCCIÓN	8
2.-HIPÓTESIS	10
3.-OBJETIVOS	10
3.1.-Objetivo general.....	10
3.2.-Objetivos específicos.....	10
4.-MARCO TEORICO	11
4.1.-Actividad antioxidante.....	11
4.1.1.-Radicales libres.....	11
4.1.2.-DPPH.....	12
4.1.3.-ABTS ⁺	13
4.1.4.-La importancia de la actividad antioxidante.....	14
4.2.-Polifenoles totales.....	14
4.3.-Metabolitos secundarios.....	15
4.4.-Flavonoides totales.....	15
4.5.-Actividad antibacteriana.....	15
4.6.-Descripción del <i>Rhaphithamnus spinosus</i>	16
5.-MATERIALES Y MÉTODOS	18
5.1.-Material Vegetal.....	18
5.2.-Preparación del extracto.....	18
5.3.-Actividad antioxidante.....	19
5.3.1.-Determinación de actividad antioxidante mediante radical DPPH en hojas y tallos.....	19
5.3.1.1.-Efecto durante el tiempo medido mediante DPPH en extracto metanólico de hojas y tallos de <i>R.spinusus</i>	20
5.3.1.2.-Equivalente de ácido gálico según ensayo realizado mediante DPPH.....	20

5.3.2.-Determinación de actividad antioxidante mediante radical ABTS ^{•+} en hojas y tallos.....	20
5.3.2.1.-Efecto durante el tiempo medido mediante ABTS ^{•+} en extracto metanólico de hojas y tallos de <i>R. spinosus</i>	22
5.3.2.2.-Equivalentes de trolox según ensayo realizado mediante ABTS ^{•+}	22
5.3.3.-Determinación de polifenoles totales.....	22
5.3.3.1.-Equivalentes de ácido gálico para el ensayo de polifenoles totales.....	23
5.4.-Determinación cualitativa de grupos de metabolitos secundarios.....	23
5.4.1.-Flavonoides.....	23
5.4.2.-Taninos.....	24
5.4.3.-Cumarinas.....	24
5.4.4.-Saponinas.....	24
5.4.5.-Alcaloides.....	24
5.4.6.-Antroquinonas oxidadas y libres.....	25
5.4.7.-Antroquinonas combinadas y/o reducidas.....	25
5.4.8.-Derivados del núcleo esteroideal.....	25
5.5.-Concentración de flavonoides totales en frutos de <i>R. spinosus</i>	26
5.5.1.-Determinación de flavonoides totales.....	26
5.5.2.-Equivalentes de catequina según ensayo de flavonoides totales.....	26
5.6.-Determinación de actividad antibacteriana.....	27
5.6.1.-Preparación del medio de cultivo.....	27
5.6.2.-Incubación de las bacterias y medidas antibacterianas.....	27
5.7.-Análisis estadístico.....	28
6.-RESULTADOS.....	29
6.1.-Rendimiento de Extracción.....	29
6.1.1.-Rendimiento de extracto obtenido desde hojas y tallos.....	29
6.1.2.-Rendimiento de extracto obtenido desde frutos (2017).....	29
6.1.3.-Rendimiento de extracto obtenido desde frutos (2018).....	29
6.2.-Actividad antioxidante de hojas y tallos del extracto metanólico de <i>Rhaphithamnus spinosus</i>	30

6.2.1.-Actividad antioxidante frente al radical DPPH.....	30
6.2.1.1.-Efecto de la capacidad antioxidante frente a DPPH durante el tiempo.....	31
6.2.1.2.-Equivalentes de ácido gálico según ensayo realizado mediante DPPH.....	32
6.2.2.-Actividad antioxidante frente al radical ABTS ^{•+}	33
6.2.2.1.-Efecto de la capacidad antioxidante frente a ABTS ^{•+} durante el tiempo.....	35
6.2.2.2.-Equivalentes de trolox según ensayo realizado mediante ABTS ^{•+}	35
6.3.-Determinación de polifenoles totales.....	37
6.4.-Determinación grupos de metabolitos secundarios.....	39
6.4.1.-Determinación de derivados del núcleo esteroidal.....	39
6.5.-Determinación de flavonoides totales.....	40
6.6.-Determinación actividad antibacteriana.....	43
7.-DISCUSIÓN.....	44
8.-CONCLUSIONES.....	46
9.-BIBLIOGRAFÍA.....	47
10.-ANEXOS.....	54



RESUMEN

Las plantas han desarrollado compuestos antioxidantes para prevenir el daño celular causado por los radicales. La planta *Rhaphithamnus spinosus* es una planta endémica de Chile con una distribución restringida entre las regiones de Coquimbo y Aysén. El objetivo de este estudio fue determinar la actividad antioxidante y antibacteriana en extracto metanólico obtenido de partes aéreas de *Rhaphithamnus spinosus*. Los ensayos mediante DPPH (2,2-difenil-1-picrilhidrazilo) y ABTS (2,2'-azino-bis (ácido 3-etilbenzotiazolina-6-sulfónico)) se utilizaron para evaluar la actividad antioxidante de un extracto de metanol y el contenido de fenoles totales y de flavonoides totales en el extracto metanólico, se determinó por métodos espectrofotométricos. El contenido fenólico total se determinó utilizando el reactivo de Folin-Ciocalteu. Además, se identificó los grupos de metabolitos secundarios en el extracto. La capacidad antibacteriana se midió frente a las bacterias *Escherichia coli* y *Staphylococcus aureus*. Los resultados mostraron una disminución del 95,76% (1,40 mg / ml de concentración de extracto) en la absorbancia de DPPH y una disminución del 90,17% (0,28 mg / ml de concentración de extracto) en la absorbancia de ABTS. El valor de IC₅₀ fue de 0,560 mg / ml, obtenido por medio de DPPH y 0,145 mg / ml, obtenido por medio de ABTS. El contenido de flavonoides, expresado como equivalentes de catequina fue $13,941 \pm 2,400 \mu\text{g} / \text{g}$ y el contenido fenólico total, expresado como equivalentes de ácido gálico fue $0,233 \pm 0,055 \text{g} / \text{g}$. Otro ensayo del contenido de flavonoides en frutas almacenadas a una temperatura de -4°C durante un año, arrojó un resultado de $16 \pm 1 \mu\text{g} / \text{g}$. En relación a los metabolitos secundarios en el extracto de hojas y tallos de *R.spinus*, se encontró la presencia de derivados del núcleo esteroidal. En cuanto a la capacidad antibacteriana, no se observó actividad antibacteriana del extracto. La actividad antioxidante observada en el extracto metanólico obtenido desde *Rhaphithamnus spinosus* está relacionada con el contenido fenólico en esta planta.

ABSTRACT

Plants have been developed antioxidant compounds for preventing cellular damage caused by radicals. The plant *Rhaphithamnus spinosus* is an endemic plant from Chile with a restricted distribution between Coquimbo and Aysen Regions. The aim of this study was to determine antioxidant and antibacterial activities of a methanolic extract obtained from aerial parts of *Rhaphithamnus spinosus*. DPPH (2,2-Diphenyl-1-picrylhydrazyl) and ABTS (2,2'-Azino-bis (3-ethylbenzothiazoline-6-sulphonic acid)) assays were used to evaluate antioxidant activity of a methanol extract and the total phenolic and flavonoid content were determined by spectrophotometric methods. The total phenolic content was determined using the Folin-Ciocalteu reagent. In addition, the groups of secondary metabolites in the methanolic extract were identified. The antibacterial capacity was measured against the bacteria *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus*. The Results showed a decrease of 95,76% (1,40 mg/ml of extract concentration) in DPPH absorbance and a decrease of 90,17% (0,28 mg/ml of extract concentration) in ABTS absorbance. The IC₅₀ value was 0,560 mg/ml, obtained by means of DPPH and 0,145 mg/ml, obtained by means of ABTS. The flavonoid content, expressed as catechin equivalents was 13,941 ± 2,400 µg/g and the total phenolic content, expressed as gallic acid equivalents was 0,236 ± 0,055 g/g. Another assay of flavonoid content in fruits stored at a temperature of -4 °C during one year, afforded a result of 16 ± 1 µg/g. Regarding the secondary metabolites in the extract of leaves and stems of *R.spinusus*, the presence of derivatives of the steroidal nucleus was found. As for the antibacterial capacity, no antibacterial activity of the extract was observed. The observed antioxidant activity of the methanolic extract obtained from *Rhaphithamnus spinosus* is related with the phenolic content in this plant.

NOMENCLATURA Y ABREVIACIONES

ABTS ⁺	: 2,2' azinobis-(3-etilbenzotiazolina)-6-sulfónico
CH ₃ OH	: Metanol
ADN	: Ácido desoxirribonucleico
AlCl ₃	: Cloruro de aluminio
DPPH	: (2,2-difenil-1-picrilhidracilo)
<i>R. spinosus</i>	: <i>Rhaphithamnus spinosus</i>
ROS	: Especies reactivas de oxígeno
RNS	: Especies reactivas de nitrógeno
FeCl ₃	: Cloruro de hierro
gr	: Gramos
H ₂ SO ₄	: Ácido sulfúrico
HCl	: Ácido clorhídrico
HNO ₃	: Ácido nítrico
IC ₅₀	: Concentración inhibitoria media
Mg	: Magnesio
mg	: Miligramo
µg	: Microgramos
NaNO ₂	: Nitrito de sodio
Na ₂ SO ₄	: Sulfato de sodio
NH ₄ OH	: Hidróxido de amonio
NaOH	: Hidróxido de sodio
Trolox	: Ácido (6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcromano-2-carboxílico)
Zn	: Zinc
NH ₃	: Amoníaco
<i>S. aureus</i>	: <i>Staphylococcus aureus</i>
<i>E. coli</i>	: <i>Escherichia coli</i>



1. INTRODUCCIÓN

Las especies vegetales han desarrollado compuestos antioxidantes con la finalidad de prevenir daños celulares producidos por radicales endógenos o exógenos. Los antioxidantes son sustancias bioactivas que pueden prevenir los efectos adversos sobre las funciones fisiológicas en el ser humano, entre ellas algunas enfermedades o procesos naturales como el envejecimiento, y que tienen relación con un desbalance del sistema oxidativo (Coronado et al. 2015). Muchas especies vegetales poseen propiedades antioxidantes, siendo muchas de estas especies vegetales alimentos de consumo de la vida diaria. La evaluación cuantitativa de polifenoles y su relación con la capacidad antioxidante en una especie vegetal es un aspecto considerado como un beneficio para la salud humana (Durazzo et al. 2015).

Algunos compuestos antioxidantes se extraen con disolventes que difieren en polaridades, según el carácter hidrofílico o lipofílico de los compuestos que se desean extraer. Entre las sustancias que suele emplearse para extraer esta clase de compuestos se encuentra el metanol (CH_3OH), y este es un solvente con un grupo hidroxilo utilizado para la extracción de compuestos con propiedades hidrofílicas (Agudo 2010). El Metanol, es un alcohol y se caracteriza por ser un líquido incoloro, volátil e inflamable. Es miscible en agua, alcoholes, ésteres, cetonas y otros solventes, siendo poco soluble en grasas y aceites (Ministerio de Ambiente, Vivienda y Desarrollo Territorial 2003).

Los métodos más aplicados para ensayar la capacidad de eliminación de radicales libres y la actividad antioxidante total del extracto de plantas son el del radical ácido 2,2' azinobis-(3-etilbenzotiazolina)-6-sulfónico (ABTS^{2+}); y el del radical libre DPPH (2,2-difenil-1-picrilhidracilo) (Re et al. 1999).

Una de las especies vegetales que habita a lo largo de Chile es el *Rhaphithamnus Spinosus* (Juss.) Moldenke, conocido comúnmente como Arrayán macho pertenece a la familia Verbenaceae. Es una especie endémica de Chile que habita desde la cordillera de la Costa hasta la precordillera andina, entre las

regiones de Coquimbo a Aysén (Cortez-Echeverría 2016). Considerando la gran extensión geográfica en que habita el *Rhaphithamnus spinosus* en el territorio chileno y, por ende, la accesibilidad que la población puede tener hacia este arbusto, se vuelve importante estudiarlo por los aportes que pudieran significar sus posibles propiedades antioxidantes y antibacterianas.



2. HIPOTESIS

El extracto metanólico de *Rhaphithamnus spinosus* posee efecto antioxidante, relacionada con su contenido en polifenoles, y efecto antibacteriano frente a las bacterias *Escherichia coli* y *Staphylococcus aureus*, relacionado con su contenido en metabolitos secundarios.

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo general

Determinar la capacidad antioxidante y antibacteriana en extracto metanólico obtenido desde partes aéreas de *Rhaphithamnus spinosus*.

3.2 Objetivos específicos

- Evaluar la capacidad antioxidante del extracto metanólico obtenido desde hojas y tallos de *R. spinosus* frente al radical libre DPPH (2,2-difenil-1-picrilhidracilo) y radical catiónico ABTS^{•+} (2-2'-azino bis (ácido 3-etilbenzotiazolin-6-sulfónico)).
- Identificar los grupos de metabolitos secundarios en el extracto metanólico obtenido desde hojas y tallos de *R. spinosus*.
- Determinar la concentración de polifenoles totales presentes en el extracto metanólico obtenido desde hojas y tallos de *R. spinosus*.
- Evaluar el contenido de flavonoides totales en extracto metanólico obtenido desde frutos de *R. spinosus*.
- Medir la capacidad antibacteriana del extracto metanólico obtenido desde hojas y tallos de *R. spinosus*, frente a las bacterias *Escherichia coli* y *Staphylococcus aureus*.

4. MARCO TEORICO

4.1 Actividad antioxidante

La acción oxidante de los radicales libres, es un problema para la salud y sus efectos negativos son debido a su capacidad de alterar el ADN (los genes), las proteínas y los lípidos o grasas ("oxidación"); los cuales pueden provenir de la contaminación atmosférica, del humo del cigarro, del consumo de aceites vegetales hidrogenados tales como la margarina, ácidos grasos trans, entre otros. (Finkel y Holbrook 2000).

El efecto antioxidante de las plantas ha resultado atractivo y beneficioso para la salud de las personas, debido a su mecanismo de acción ante ROS (Especies Reactivas de Oxígeno) en términos de reducción de estos compuestos nocivos en el organismo. Los antioxidantes actúan como agentes estabilizadores de radicales libres inhibiendo la peroxidación lipídica. Este proceso está involucrado en el desarrollo de varias enfermedades comunes, las cuales incluye la aterosclerosis y desordenes neurodegenerativos como la enfermedad de Alzheimer (Glass y Witztum 2001). En la actualidad, la actividad antioxidante de vegetales es utilizada en terapias no solo para prevenir diversas enfermedades sino también para combatirlas (Núñez 2011).

Por lo anterior, diversos autores están en la búsqueda de compuestos como nuevas fuentes antioxidantes en especies de plantas; y estos deben enfocarse hacia los beneficios que producen los antioxidantes en la salud de modo preventivo (Galeano et al, 2010). Una forma natural de prevención está vinculado al tipo de alimentación de las personas, destacándose la dieta mediterránea mediante el consumo de alimentos ricos en antioxidantes a través de frutas, verduras, frutos secos y vino (Urquiaga 2017).

4.1.1 Radicales libres

Un radical libre es un compuesto químico que posee la capacidad de encontrarse naturalmente de forma independiente y que presenta uno o más electrones desapareados en su estructura (Agudo 2010). Como consecuencia, los radicales

libres son altamente reactivos, por lo tanto poseen una vida media del orden de milisegundos, aunque varía según el tipo de radical libre (Halliwell et al, 1992). Los radicales libres también son conocidos como especies reactivas de oxígeno, ROS, y especies reactivas del nitrógeno, RNS (Agudo 2010).

Cuando existe un desbalance entre la producción de ROS y los sistemas biológicos de captura, se producen patologías como cáncer, aterosclerosis, diabetes mellitus, hipertensión, entre otras (Zapata et al. 2013).

Los métodos más aplicados para evaluar la capacidad de eliminación de radicales libres y la actividad antioxidante total de extractos de plantas mediante un espectrofotómetro son el del radical (1,1-difenil-2-picrilhidrazilo) DPPH, desarrollado por Blois (1958), además del radical catiónico ABTS^{•+} (2-2'-azino bis(ácido 3 etilbenzotiazolin-6-sulfónico), método desarrollado por Re et al. (1999), ambos métodos son evaluados mediante espectrofotometría a 517 nm y 734 nm, respectivamente.

4.1.2 DPPH

El radical libre DPPH (2,2-difenil-1-picrilhidrazilo) es ampliamente utilizado en la evaluación de propiedades antioxidantes, debido a su notable estabilidad y a su color intenso (Gavira et al. 2009).

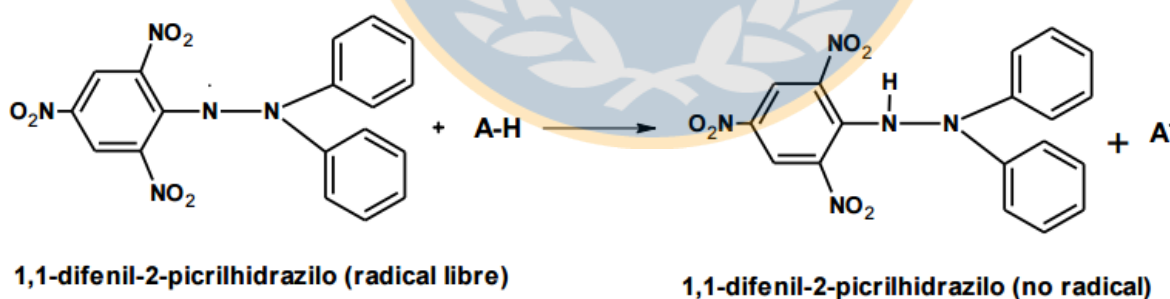


Figura 1. Estructura del DPPH antes y después de la reacción con el antioxidante (Alam et al. 2012).

Este proviene de la molécula de cisteína. La molécula 1,1-difenil-2-picril-hidrazilo (DPPH) es conocida como un radical libre estable debido a la deslocalización de un

electrón desapareado sobre la molécula completa, por lo cual la molécula no se dimeriza, como es el caso de la mayoría de los radicales libres. La deslocalización del electrón también intensifica el color violeta intenso típico del radical, el cual absorbe en metanol a 517 nm. Cuando la solución de DPPH reacciona con el sustrato antioxidante que puede donar un átomo de hidrógeno como se muestra en la figura 1, el color violeta se desvanece. El cambio de color es monitoreado espectrofotométricamente y es utilizado para la determinación de los parámetros para las propiedades antioxidantes (Tovar 2013).

4.1.3 ABTS^{•+}

El radical catiónico ABTS^{•+} (2-2'-azino bis (ácido 3 etilbenzotiazolin-6-sulfónico) verde-azulado es un cromóforo generado por una reacción de oxidación del ABTS con persulfato de potasio (K₂S₂O₈) (Fig. 2) (Mesa et al. 2009). La máxima absorción de ABTS se produce en metanol a 734 nm, y la reacción de ABTS con el sustrato antioxidante produce una desaparición del color verde-azulado.

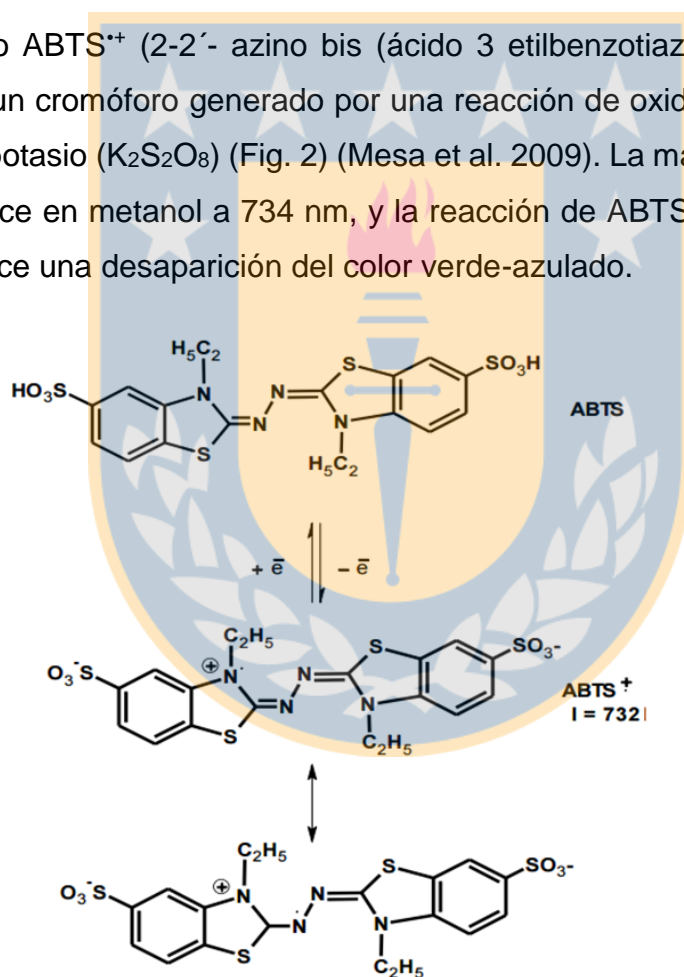


Figura 2. Estructura del ABTS y ABTS^{•+} radical catión (Osman et al. 2006).

4.1.4 La importancia de la actividad antioxidante

La acción de los radicales libres en el metabolismo celular humano se relaciona con diversas enfermedades crónico-degenerativas, tales como el cáncer, la diabetes y algunas cardiopatías (Maldonado et al. 2010). Sin embargo, varios estudios han indicado que, al acudir al consumo de fuentes exógenas de antioxidantes, mediante la ingesta de ciertos alimentos con tales propiedades se obtiene resultados óptimos disminuyendo el riesgo por estrés oxidativos frente a enfermedades crónico-degenerativas (Coronado et al. 2015). En este sentido, se ha explorado la actividad antioxidante como un posible tratamiento de la demencia y en la enfermedad de Alzheimer (Wilson et al. 2017)

La importancia de la actividad antioxidante radica en los beneficios que esta aporta para la salud humana. Específicamente mediante el consumo de alimentos con propiedades antioxidantes es posible aumentar la longevidad corporal, y se han observado buenos resultados disminuyendo el riesgo por estrés oxidativo frente a enfermedades como el cáncer, la diabetes, enfermedades cardiovasculares, enfermedad de Parkinson u otras neurodegenerativas (Imosemi 2013; Coronado et al. 2015; Ulloa-Inostroza et al. 2017).

4.2. Polifenoles totales

Los antioxidantes más abundantes en nuestra dieta son los polifenoles (Manach et al. 2004). Los polifenoles pueden tener otras actividades biológicas específicas que afectan la expresión génica (Yuan et al. 2005), además de sus propiedades antioxidantes.

De acuerdo con Frankel et al. (1995) uno de los métodos para la detección de polifenoles totales es el de Folin-Ciocalteu y este consiste en una reacción de óxido-reducción. Este método se basa en que los compuestos fenólicos reaccionan con el reactivo de Folin-Ciocalteu a pH básico, dando lugar a una coloración azul, la cual es proporcional al porcentaje de compuestos fenólicos y se produce a una absorción de 765 nm por espectrofotometría (Rebolo 2007).

4.3. Metabolitos secundarios

Las plantas producen metabolitos secundarios para protegerse de los agentes patógenos y herbívoros y/o para influir en el crecimiento de las plantas vecinas (Sirikantaramas et al. 2008).

Según Avalos y Pérez (2009) estos metabolitos se agrupan en cuatro clases principales:

1. Alcaloides
2. Compuestos fenólicos: Cumarinas, Flavonoides, Lignina y Taninos.
3. Terpenos: Hormonas, Pigmentos y Aceites esenciales.
4. Glicósidos: Saponinas, Glicósidos cardiacos y/o cianogénicos y Glucosinolatos.

4.4.- Flavonoides totales

Los flavonoides constituyen un grupo grande y diverso de compuestos fenólicos, los cuales cumplen una gran cantidad de funciones (Agati et al. 2012); como la defensa frente a patógenos, debido a efectos antifúngicos y bactericidas (Harborne y Williams 2000). Además, ejercen efectos beneficiosos multifacéticos en la salud humana, brindando protección cardiovascular y contra enfermedades oncológicas (Van der Sluis et al. 1997; Williamson et al. 2000), también son importantes como potentes antioxidantes (Rice-Evans et al, 1997).

Según Rice-Evans et al. (1997) los estudios sobre las propiedades de eliminación de radicales libres debido a los flavonoides han permitido la caracterización de los principales componentes fenólicos entre los compuestos fitoquímicos naturales como moléculas antioxidantes.

4.5. Actividad antibacteriana

La incidencia alta de plagas durante los últimos años ha llevado a el uso indiscriminado de compuestos químicos para el control de patógenos (Quintero et al. 2001), lo cual ha generado deterioro en el medio ambiente y la aparición de

poblaciones de insectos resistentes, en consecuencia la eficacia en el control de insectos se ha visto disminuida (Soberón y Bravo 2007). Por lo tanto, en los últimos años se ha incrementado el interés en el uso de extractos naturales como alternativa para el control de microorganismos patógenos (López et al. 2007).

Escherichia coli y *Staphylococcus aureus* han sido ampliamente utilizados como microorganismos modelos (Michael y Carter 2000) para evaluar la actividad antibacteriana en extractos vegetales, representando a bacterias Gram negativas y Gram positivas respectivamente.

4.6. Descripción de *Rhaphithamnus spinosus*

La especie *Rhaphithamnus spinosus*, conocida comúnmente como Arrayán macho o espino negro, es una planta tipo arbusto perteneciente a la familia Verbenaceae (Moldenke 1937). Según la descripción de Cortez-Echeverría (2016). Es una especie endémica de Chile que habita desde la cordillera de la Costa hasta la precordillera andina, entre las regiones de Coquimbo y Aysén, este arbusto crece habitualmente en los bosques de quebradas. Se caracteriza por medir entre 2 a 6 metros de alto, con corteza agrietada y ramosa. Desarrolla hojas pequeñas que en su cara superior lucen de tono verde oscuro y en blanquecino en el envés; desde la axila de éstas crecen espinas amarillas que pueden llegar hasta los 2 cm de largo. Sus flores son de tonalidad violáceo-pálido adosadas mediante un corto peciolo (Fig.3). Su fruto es de aspecto globoso y de color azul-violáceo. Florece entre los meses de Octubre y Noviembre.

Con respecto a los usos habituales en que era empleado esta especie por algunos pueblos indígenas de Chile, se usaba para encender fuego mediante la fricción de sus ramas (Wilhelm de Môsbach 1992). También ha sido utilizado en algunas regiones como planta medicinal al frotarlo en la piel para mejorarla de algunas infecciones como la tiña (Valencia 2013). Inclusive ha tenido usos mágico-supersticiosos considerándose un árbol santo cuyas ramas y hojas eran usadas prácticamente como amuletos de protección (Meza et al. 1991). Respecto de las

investigaciones sobre sus propiedades, se ha mostrado que tiene efecto insectistático, esto es, que su acción como polvo vegetal genera la disminución de la cantidad de insectos *Sitophilus Zeamais* Motschulsky (Parra et al. 2007).

Existen diversas investigaciones que indican que las especies vegetales chilenas poseen diversas propiedades antioxidantes. Entre ellas destacan algunas especies de berberis como *Aristotelia chilensis* (Peña 2015), *Ugni Molinae* (Avello et al. 2005; Obara et al. 2017), *Berberies darwinii*, *Luma apiculata* y *Vaccinium corymbosum* (Lillo et al. 2016), *Fragaria x ananassa*, *Vaccinium myrtillus*, *Vaccinium corymbosum* y *Fragaria chilensis* (Fredes 2009). Sin embargo, la especie *Rhaphithamnus spinosus* no ha sido investigada.

Estas investigaciones dan cuenta del escaso conocimiento que se tiene respecto de *Rhaphithamnus spinosus*, lo que alienta a investigarla al ser una planta silvestre cuyo hábitat se extiende en diversas regiones de Chile.



Figura 3. Hojas, tallos y frutos de *Rhaphithamnus spinosus*.

5. MATERIALES Y MÉTODOS.

5.1 Material Vegetal

Se utilizaron hojas y tallos de *Rhaphithamnus spinosus* la cual fue recogida desde la comuna de Contulmo, VIII región del BioBío, Chile. Una vez obtenido el material vegetal este fue lavado en el laboratorio y secado durante una semana a temperatura ambiente.

5.2 Preparación del extracto

Las hojas y tallos de *R. spinosus* fueron depositadas en bolsas de papel filtro y pesadas en balanza analítica (Mettler Toledo, AB204-5). Además, los frutos tanto recolectados el 2017 (Marzo) y el 2018 (Marzo) por separado, se dispusieron en un equipo Soxhlet (GLASSCO, 3049/8) a 70°C agregándose 200ml de metanol aproximadamente, de modo que sobrepasara la bolsa de papel con la planta, manteniéndose la extracción en el equipo hasta que el solvente quedara prácticamente incoloro en el sifón del equipo Soxhlet. Luego al extracto, obtenido con metanol se le extrajo el solvente desde el balón en el rotavapor (IKA, modelo HB10 digital) a una temperatura entre los 43° a 45°C con una rotación de 90 rpm, para obtener finalmente un extracto concentrado. Posteriormente el extracto fue tratado con cloroformo para almacenarlo en placa Petri y secarlo en estufa (MEMMERT, UFB 500) a una temperatura de 35°C, hasta peso constante. Al obtener el extracto seco se determinó el rendimiento promedio de extracción en relación al peso inicial de la planta seca, con el peso del extracto seco. El rendimiento promedio de la extracción se determinó mediante la siguiente formula (Fig. 4). Para preparar el extracto desde frutos fue utilizado el mismo método que para el caso de hojas y tallos.

$$\text{Rendimiento de extracción (\%)} = \frac{\text{Peso final del extracto seco (gr)} * 100}{\text{Peso inicial del vegetal seco (gr)}}$$

Figura 4. Fórmula para calcular el rendimiento de obtención del extracto.

5.3. Actividad antioxidante

5.3.1. Determinación de actividad antioxidante mediante radical DPPH en hojas y tallos de *R. spinosus*.

Se empleó la metodología diseñada por Blois en (1958) modificada por Brand-Williams et al. (1995). Primero se procedió a preparar en un matraz de 50 ml con una solución stock de 1,8 mg de DPPH (2,2-difhenyl-1-picrilhydrazyl) diluyéndolo en metanol a una concentración de 0,036mg/ml, posteriormente la solución se ajustó a una absorbancia entre 0,80 y 0,90 a una longitud de onda de 517nm en un espectrofotómetro (termo Scientific Genesis 10UV). Luego se preparó una solución stock de 2,5mg/ml del extracto metanólico, y desde esta concentración madre del extracto se realizó una disolución seriada. Las concentraciones utilizadas fueron 0,05, 0,20, 0,35, 0,50, 0,65, 0,80, 0,95, 1,10, 1,25 y 1,40 mg/ml. Posteriormente en 10 tubos de ensayo grandes rotulados para cada concentración se añadió 2ml del radical DPPH, luego se agregó 175 µL de cada una de las concentraciones en los tubos rotulados; se incubo en agitación constante por 1 minuto, luego las mezclas fueron trasvasijadas a un tubo de lectura de espectrofotómetro, para finalmente leer la absorbancia a 517nm utilizando como blanco metanol y como control negativo 2ml de DPPH más 175 µL de metanol. Este ensayo se realizó por triplicado.

La actividad antioxidante se determinó calculando el porcentaje de inhibición a partir de los resultados de absorbancia obtenidas en el ensayo, el cual representa el porcentaje de disminución de absorbancia del radical libre DPPH.

El porcentaje de inhibición (Fig. 5) se obtuvo mediante la siguiente fórmula:

$$\% \text{ Inhibición} = \frac{(\text{Absorbancia control negativo} - \text{Absorbancia muestra}) * 100}{\text{Absorbancia control negativo}}$$

Figura 5. Fórmula para determinar el porcentaje de inhibición.

Estos datos fueron llevados a planilla Excel 2010, en donde se obtuvo el IC₅₀ o índice de inhibición medio, el cual se calculó con la ecuación de la recta obtenida

desde la curva de porcentaje de disminución de absorbancia versus la concentración del extracto. El IC₅₀ es la concentración de extracto necesaria para disminuir en un 50% la absorbancia.

5.3.1.1 Efecto durante el tiempo medido con DPPH en extracto metanólico de hojas y tallos de *R. spinosus*.

Al obtener el valor de IC₅₀ se realizó un ensayo de cinética para observar el efecto del extracto en relación al radical DPPH, se añadió a un tubo de ensayo grande 2 ml de DPPH más 175 µL del extracto metanólico de *Rhaphitamnus spinosus* que corresponde a la concentración del IC₅₀, esta mezcla se agitó vigorosamente y se incubó durante 1 minuto, luego se midió su absorbancia a 517 nm durante 3 horas realizando cada lectura en el espectrofotómetro cada 5 minutos, se utilizó como blanco metanol. El ensayo se realizó por triplicado en el espectrofotómetro (Thermo Scientific Genesys 10 UV).

5.3.1.2 Equivalentes de Ácido Gálico según ensayo realizado mediante DPPH

Se realizó la determinación de ácido gálico mediante la mezcla de 2 ml de DPPH con 175 µL del extracto metanólico de *R. spinosus* a una concentración de 0,560 mg/ml, la cual se agitó vigorosamente por un minuto para luego ser traspasada a un tubo de lectura y se leyó la absorbancia a 517nm, en triplicado. Posteriormente las medidas de absorbancia se interpolaron en una curva de calibración de ácido gálico hechas en duplicado con las siguientes concentraciones 0,01; 0,02; 0,03; 0,04; 0,05 mg/ml de ácido gálico. Los resultados con desviación estándar se expresaron como X µg de ác. gálico contenidos en 1000000 µg (1g) de extracto metanólico de *R. spinosus*

5.3.2. Determinación de actividad antioxidante mediante radical catiónico ABTS^{•+} en hojas y tallos de *R. spinosus*.

Se empleó la metodología de Kuskoski et al. (2005) sujeta a modificaciones. Primero se procedió a preparar en un matraz de 50 ml una solución stock de 180,117 mg del reactivo ABTS (2,2'-azino-bis- (3-etil benzotiazolin-6-sulfonato de amonio) (7 mM) y

33,111 mg Persulfato de Potasio (2,45 mM), aforando con metanol (Equilab, grado técnico); Posteriormente, la solución se ajustó a una absorbancia de $0,70 \pm 0,2$ a una longitud de onda de 734 nm en un espectrofotómetro (termo Scientific Genesis 10UV). Luego se preparó una solución stock de 0,8 mg/ml del extracto metanólico y desde esta concentración madre del extracto se realizó una disolución seriada. Las concentraciones utilizadas fueron 0,01, 0,04, 0,07, 0,10, 0,13, 0,16, 0,19, 0,22, 0,25, 0,28, 0,31 y 0,34 mg/ml. Sin embargo se observó absorbancia fuera de rango entre las concentraciones 0,31 y 0,34 mg/ml, por lo tanto, se decidió utilizar las concentraciones 0,01, 0,04, 0,07, 0,10, 0,13, 0,16, 0,19, 0,22, 0,25 y 0,28 mg/ml. Posteriormente, en 10 tubos de ensayo grandes rotulados para cada concentración se agregó 2 ml del radical catiónico ABTS^{•+}, luego se agregó 175 μ L de cada una de las concentraciones en los tubos rotulados; se incubó en agitación constante por 1 minuto, luego las mezclas fueron trasvasiadas a un tubo de lectura de espectrofotómetro, para finalmente leer la absorbancia a 734 nm utilizando como blanco metanol y como control negativo 2ml de ABTS^{•+} más 175 μ L de metanol. Este ensayo se realizó por triplicado.

La actividad antioxidante se determinó calculando el porcentaje de inhibición a partir de los resultados de absorbancia obtenidas en el ensayo, el cual representa el porcentaje de disminución de absorbancia del radical catiónico ABTS^{•+}.

El porcentaje de inhibición (Fig. 6) se obtuvo mediante la fórmula:

$$\% \text{ Inhibición} = \frac{(\text{Absorbancia control negativo} - \text{Absorbancia muestra}) * 100}{\text{Absorbancia control negativo}}$$

Figura 6. Fórmula para determinar el porcentaje de inhibición

Estos datos fueron llevados a planilla Excel 2010, en donde se obtuvo el IC₅₀ o índice de inhibición medio, el cual se calculó con la ecuación de la recta obtenida desde la curva de porcentaje de disminución de absorbancia versus la concentración del extracto.

5.3.2.1. Efecto durante el tiempo medido con ABTS^{•+} en extracto metanólico de hojas y tallos de *R. spinosus*.

Al obtener el valor de IC₅₀ se realizó un ensayo de cinética para observar el efecto del extracto en relación al radical ABTS^{•+}, se añadió a un tubo de ensayo grande 2 ml de ABTS^{•+} más 175 µL del extracto metanólico de *R. spinosus* que corresponde a la concentración del IC₅₀ esta mezcla se agitó vigorosamente y se incubó durante 1 minuto, luego se midió su absorbancia a 734 nm durante 3 horas realizando cada lectura en el espectrofotómetro cada 5 minutos, se utilizó como blanco metanol. El ensayo se realizó por triplicado en el espectrofotómetro (Thermo Scientific Genesys 10 UV).

5.3.2.2 Equivalentes de Trolox según ensayo realizado mediante ABTS^{•+}

La determinación de equivalente de Trolox (Aldrich) se realizó mediante la mezcla de 175 µg/ml del extracto metanólico de *R. spinosus* a una concentración de 0,145 mg/ml con 2 ml de ABTS^{•+}, se agitó constantemente por 1 minuto y se leyó la absorbancia a 734 nm (por triplicado). Luego la absorbancias obtenidas se interpolan en una curva de calibración de Trolox hechas con las siguientes concentraciones 0,005, 0,010, 0,015, 0,020, 0,025, 0,030, 0,035, 0,040, 0,045, 0,050, 0,055 mg/ml, la curva de calibración fue realizada con medidas en duplicado. Los resultados con desviación estándar se expresaron como X µg de Trolox contenidos en 1000000 µg (1g) de extracto metanólico de *R. spinosus*.

5.3.3 Determinación de Polifenoles totales

La concentración de compuestos fenólicos totales se determinó de acuerdo al método calorímetro de Folin-Ciocalteu (Merck) propuesto por Singleton et al. (1999) a una longitud de onda de 765nm en espectrofotómetro (Thermo Scientific Genesys 10 U.V). A partir de una concentración madre de 1mg/ml del extracto metanólico de *R. spinosus* se tomó una alícuota de 0,225 ml quedando una concentración de 0,009 mg/ml en 25 ml, luego se añadió agua, 1,25 ml de reactivo Folin-Ciocalteu, 5 ml de Carbonato de sodio (20% V/V) y se aforó a 25 ml con agua destilada, posteriormente se agitó y se incubó en oscuridad por 30 minutos a

temperatura ambiente. En paralelo fue medida una solución control con el mismo procedimiento, sin agregar el extracto. Este ensayo se realizó en triplicado.

5.3.3.1. Equivalentes de ácido gálico para el ensayo de Polifenoles totales

A partir de la determinación de polifenoles totales, las medidas se compararon con una curva estándar de ácido gálico (Merck) con las concentraciones 0, 1, 2, 3, 4, 5 y 6 µg/ml, realizándose las medidas en duplicado en el espectrofotómetro (Thermo Scientific Genesys 10 U.V) a una longitud de onda de 765 nm. Para esta curva estándar se realiza el mismo procedimiento del método calorimétrico de Folin-Ciocalteu utilizado para el extracto no obstante en vez de agregar extracto se agregó ácido gálico. Los resultados obtenidos con desviación estándar se expresaron en X µg de ácido gálico equivalente en 1 gr del extracto metanólico de *R. spinosus*.

5.4.-Determinación cualitativa de grupos de Metabolitos secundarios

Fueron investigados los grupos de metabolitos secundarios a través de test de reconocimiento de flavonoides, taninos, cumarinas, saponinas, alcaloides, antroquinonas y derivados del núcleo esteroidal, según la metodología de García et al (2003) con algunas modificaciones, como criterio para valorar el resultado observado, se utilizó el sistema de cruces donde la presencia abundante se denoto con (+++), presencia relativamente abundante (++) , presencia escasa (+) y no detectada (-).

Los diferentes metabolitos se observaron mediante la metodología descrita a continuación.

5.4.1 Flavonoides

El material vegetal (hojas y tallos) se extrajo con metanol absoluto a baño maría, luego se filtró, y el filtrado se dispuso en dos tubos de ensayo, uno con magnesio y

otro con zinc. A continuación se adicionó ácido (HCl) entre 3 a 4 gotas. De esta manera, se determinó la presencia o ausencia de flavonas (anaranjado), y la de flavonoles (rojo cereza) (Pavithra et al. 2013)

5.4.2 Taninos

Se extrajo desde una solución acuosa, en un tubo se hirvió el material vegetal seco con agua de la cual se obtuvo una solución acuosa que fue traspasada a otro tubo y se dejó enfriar, luego se agregó 2-3 gotas de cloruro de hierro (III) (FeCl_3) al 5%.

5.4.3 Cumarinas

Se mezcló material vegetal seco con H_2SO_4 al 10% y se agitó, luego se filtró. Luego se trató con un solvente orgánico. Posteriormente la fase orgánica se decantó a un tubo de ensayo, y se evaporó a sequedad, para luego suspenderla en agua caliente y luego agregarle gotas de amoníaco concentrado. Luego se observó la presencia de cumarinas al presentarse fluorescencia color celeste bajo luz UV 366nm.

5.4.4 Saponinas

Se dispuso material vegetal seco con agua en un tubo de ensayo el cual fue agitado vigorosamente por un minuto aproximado. En el caso de contener saponina se genera espuma constante en la agitación (García et al. 2010)

5.4.5 Alcaloides

El material vegetal seco se trató con un solvente orgánico poco polar (éter, cloroformo) en un medio alcalino (amoníaco NH_3), el cual se filtró. Una vez filtrado, se decantó la fase orgánica sobre un vidrio reloj y se evaporó el solvente en un manto calefactor. El residuo se trató con 3 gotas de HCl al 1% y 2 gotas de Lugol. Se determinó la presencia o ausencia de alcaloides a partir de la observación de un precipitado oscuro (George et al. 2010).

5.4.6 Antroquinonas oxidadas y libres

Este tipo de compuestos fue evaluado mediante la reacción de Bontraeger. Se dispuso el material vegetal seco en un tubo de ensayo con cloroformo, y luego se filtró. A continuación, bajo campana el filtrado se colocó en un tubo de ensayo donde se agregó 1ml de Hidróxido de amonio (NH_4OH) concentrado y se agitó vigorosamente por unos minutos. El resultado positivo es la formación de un color rojo cereza o rosado (García et al. 2010).

5.4.7 Antroquinonas combinadas y/o reducidas

Este ensayo cualitativo se realizó mediante la reacción de Borntraeger, se dispuso el material vegetal seco en un tubo de ensayo con agua acidulada con ácido nítrico (HNO_3) al 65%, se agitó y luego se llevó a ebullición en un manto calefactor bajo campana de extracción seguidamente se filtró y se dejó enfriar, Posteriormente, se agitó con cloroformo y se formó 2 fases, la fase orgánica se decantó en un tubo de ensayo y se añadió 1ml de NH_4OH concentrado, se agitó vigorosamente por unos minutos. El resultado positivo es la formación de coloración cereza (García et al. 2010).

5.4.8 Derivados del núcleo esteroidal

El material vegetal seco fue disuelto en cloroformo y luego se filtró. El filtrado obtenido se secó con Na_2SO_4 anhidro y el solvente restante se evaporó mediante calor a baño maría bajo campana de extracción. Al residuo obtenido se le practicó la reacción de Liebermann, la cual consta en disolver el residuo en 1ml de anhidro acético en baño maría, bajo campana, posteriormente se enfrió y se adicionó H_2SO_4 concentrado. El resultado positivo de la muestra consiste en la presencia de una coloración verde intenso (García et al. 2010).

5.5.- Concentración de Flavonoides totales en frutos de *R. spinosus*

5.5.1.- Determinación de Flavonoides totales

La concentración de flavonoides totales se determinó de acuerdo a la metodología diseñada por Gajula et al. (2009) con modificaciones, a una longitud de onda de 510 nm en espectrofotómetro (Thermo Scientific Genesys 10 U.V). A partir de una concentración madre de 10mg/ml de extracto metanólico de frutos de *R. spinosus* se tomó una alícuota de 0,2 ml quedando a una concentración de 0,4 mg/ml, en un volumen de 5ml, y en paralelo también se midió 0,2 ml de una solución de extracto metanólico de frutos de *R. spinosus* (10mg/ml) almacenados a una temperatura de -4 °C durante un año, ambas alícuotas fueron añadidas en paralelo a 0,150 ml de NaNO₂ al 5%, se agitó y se dejó reposar por 6 minutos. A continuación se añadió 0,300 ml de AlCl₃ al 10% recién preparado y se incubó por 5 minutos. Luego se añadió 1ml de NaOH 1M. Finalmente se procedió a ajustar el volumen a 5ml con agua destilada y luego a leer la absorbancia a 510nm en espectrofotómetro (Thermus Scientific Genesys 10 U.V) utilizando como blanco la misma solución sin muestra. Este ensayo se realizó en triplicado.

5.5.2.- Equivalente de Catequina según ensayo de Flavonoides totales

Se realizó la curva de calibración de catequina mediante la preparación de está. Primero se disolvió 12mg de catequina en un volumen de 25ml de agua destilada, a partir de esta solución se tomaron alícuotas para obtener concentraciones de 2,5; 5; 10; 15; 20; 30 µg/ml de catequina en volúmenes de 5ml utilizadas en la curva de calibración, la cual fue realizada en duplicado. Las medidas fueron leídas en el espectrofotómetro (Thermo Scientific Genesys 10 U.V) a una longitud de onda de 510 nm Los resultados obtenidos se expresaron en X µg de catequina equivalente por 1 gr de extracto metanólico desde frutos de *R. spinosus*.

5.6. Determinación de actividad antibacteriana

5.6.1. Preparación del medio de cultivo

Se determinó la actividad antibacteriana del extracto metanólico de *R. spinosus* frente a las bacterias *Staphylococcus aureus* (bacteria Gram positiva) y *Escherichia coli* (bacteria Gram negativa), las cuales fueron facilitadas por el Laboratorio de Microbiología de la Universidad de Concepción, Campus Los Ángeles. Para *S. aureus* se tomó 14,5 gr de agar BAIRD-PARKER el cual fue diluido en 250 ml de agua destilada. En tanto para *E. coli* se pesó 9 gr de agar EMB-Levine y se disolvió en 250 ml de agua destilada. Luego se llevó al autoclave (alrededor de unos 20 minutos se demora el proceso) para su esterilización y se procedió a esperar que la temperatura baje hasta alrededor de 50°C. Una vez enfriados los medios se llevaron a cámara de flujo laminar y se procedió a verter las mezclas en placas Petri, alrededor de 20 ml por placa, evitando la formación de burbujas en la placa y evitando que no exista material sólido coagulado en el medio. Se sellaron con parafilm y se guardaron las placas hasta su posterior utilización a temperatura ambiente.

5.6.2. Incubación de las bacterias y medidas antibacterianas

Las bacterias se activaron en caldo de cultivo en donde *S. aureus* se cultivó en caldo BHI Broth (Cerebro corazón) a 37°C y *E. coli* en caldo de cultivo EC Broth (*Escherichia coli*) a 37°C por un periodo de tiempo de 48 horas, una vez que las bacterias estaban propagadas se procedió a traspasarlas a las placas con la ayuda de un asa Drigalsky por todo el medio de cultivo. A continuación se tomaron discos de papel filtro con pinzas estériles, 3 de esos discos se empaparon con 10 µl de extracto cada uno y uno empapado con agua destilada, el cual representa el control negativo del experimento, los cuales fueron llevados a la placa Petri con la bacteria. El procedimiento se realizó bajo inocuidad, limpiando el mesón con alcohol previo a la inoculación y con el mechero prendido; además se trabajó cerca de él durante todo el proceso.

Las concentraciones del extracto fueron 4 (100, 200, 300, 400 mg/ml), para investigar el efecto inhibitorio en cada bacteria. Cada concentración se midió por triplicado para cada bacteria, con un total de 24 placas, 12 por experimento.

Los resultados fueron analizados mediante la presencia de halos de inhibición bacteriana.

5.7 Análisis estadístico

Los resultados serán analizados por medio de Software Microsoft Excel 2010, calculando su desviación estándar.

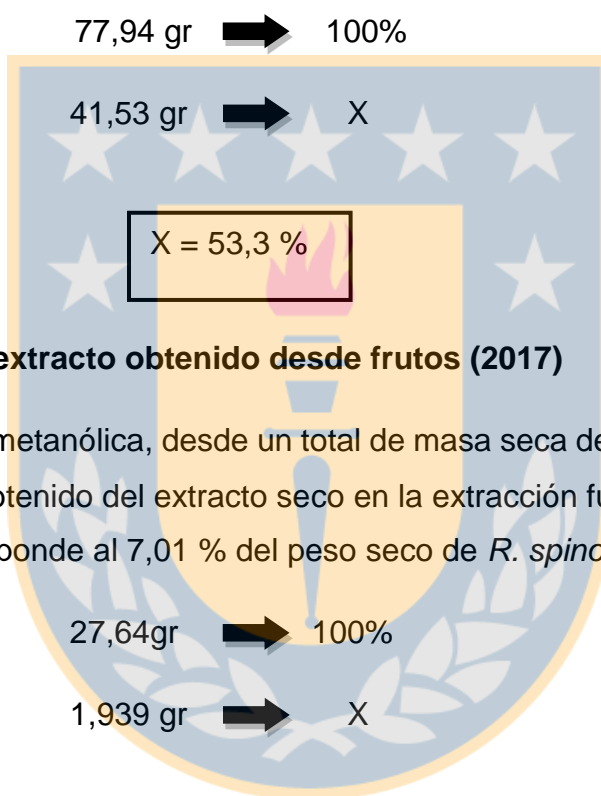


6. RESULTADOS

6.1 Rendimiento de Extracción

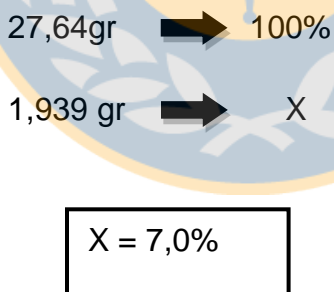
6.1.1-Rendimiento de Extracto obtenido desde hojas y tallos

Se realizó la extracción metanólica en el equipo Soxhlet, desde un total de masa seca de *R. spinosus* de 77,939 gr. El peso final obtenido del extracto seco en la extracción fue de 41,53 gr. El extracto obtenido corresponde al 53,3 % del peso seco de *R. spinosus*.



6.1.2- Rendimiento de extracto obtenido desde frutos (2017)

Se realizó la extracción metanólica, desde un total de masa seca de *R. spinosus* de 27,64 gr. El peso final obtenido del extracto seco en la extracción fue de 1,94 gr. El extracto obtenido corresponde al 7,01 % del peso seco de *R. spinosus*.



6.1.3- Rendimiento de extracto obtenido desde frutos (2018)

Se realizó la extracción metanólica en el equipo Soxhlet, desde un total de masa seca de *R. spinosus* de 33,3079 gr. El peso final obtenido del extracto seco en la extracción fue de 21,7147 gr. El extracto obtenido corresponde al 65,2 % del peso seco de *R. spinosus*

33,31 gr → 100%

21,71 gr → X

$$X = 65,2 \%$$

6.2 Actividad antioxidante de hojas y tallos del extracto metanólico de *Rhaphithamnus spinosus*.

6.2.1 Actividad antioxidante frente al radical DPPH.

En el ensayo realizado con el radical DPPH, se evaluaron las 10 concentraciones siguientes:

0,05, 0,20, 0,35, 0,50, 0,65, 0,80, 0,95, 1,10, 1,25 y 1,40 mg/ml, las cuales permitieron observar la actividad antioxidante positiva del extracto de *R. spinosus* a bajas concentraciones (Anexo 1), obteniéndose una disminución de 95,76% con la concentración más alta (1,40 mg/ml) y una mínima actividad de 6,68% con la concentración mínima de 0,05 mg/ml.

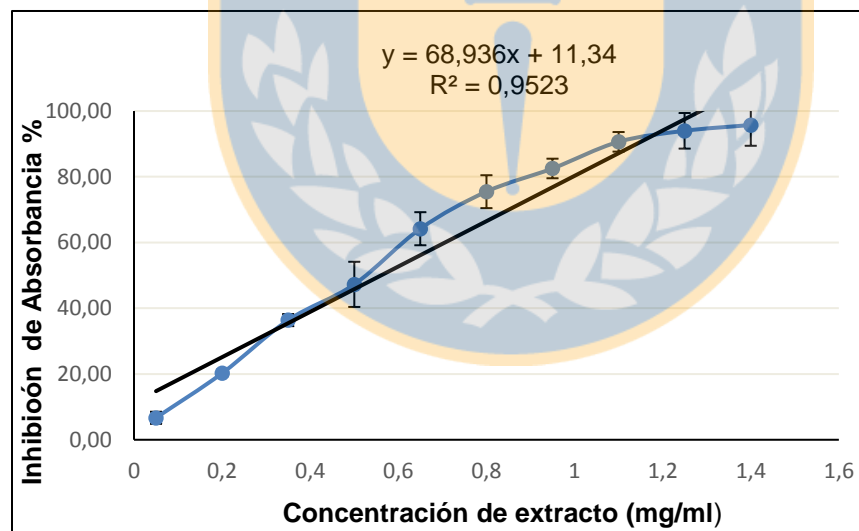


Figura 7. Porcentaje de disminución de absorbancia de DPPH con diferentes concentraciones del extracto metanólico de *R.spinusus*.

El cálculo del IC_{50} se resolvió a partir de la ecuación de la curva como, siendo 0,560 mg/ml.

$$y = 68,936x + 11,34$$

$$50 = 68,936x + 11,34$$

$$\frac{50 - 11,34}{68,936} = X$$

$$X = 0,560 \text{ mg/ml}$$

6.2.1.1. Efecto de la capacidad antioxidante frente a DPPH durante el tiempo

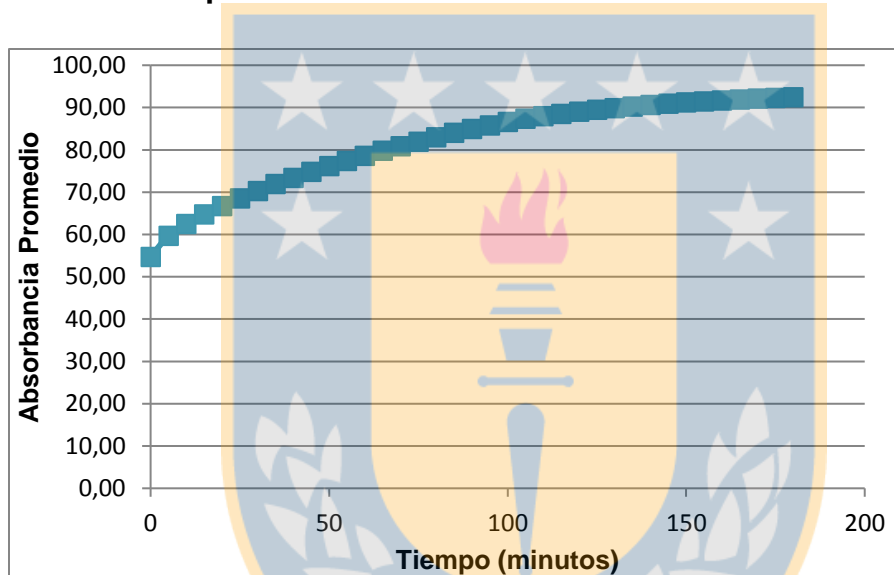


Figura 8. Efecto antioxidante del extracto metanólico de *R. spinosus* en el tiempo en concentración del IC₅₀. Periodo de la cinética es de 3 horas (180 minutos).

Se evaluó el efecto antioxidante a través del ensayo de cinética del extracto metanólico de *R. spinosus* mediante el radical DPPH a una concentración de 0,560 mg/ml (IC₅₀), el cual midió la absorbanza cada 5 minutos durante 3 horas, la absorbanza del control negativo fue 0,799. Se observó una disminución de la absorbanza al inicio de 0,351 la cual representa el 54,7% de inhibición del radical DPPH (Fig 8) esta disminución se mantiene en forma gradual hasta finalizar los 180 minutos alcanzando un mínimo de absorbanza de 0,059 que representa el 92,4% de inhibición (Anexo 2).

6.2.1.2. Equivalentes de ácido gálico según ensayo realizado mediante DPPH

La determinación de equivalentes de ácido gálico se llevó a cabo mediante la ecuación de la curva de calibración (Fig. 9) (Anexo 3) desde la absorbancia medida con el extracto metanólico de *R. spinosus* a la concentración de 0,560 mg/ml a 517 nm del extracto de *R. spinosus* en triplicado (Anexo 4).

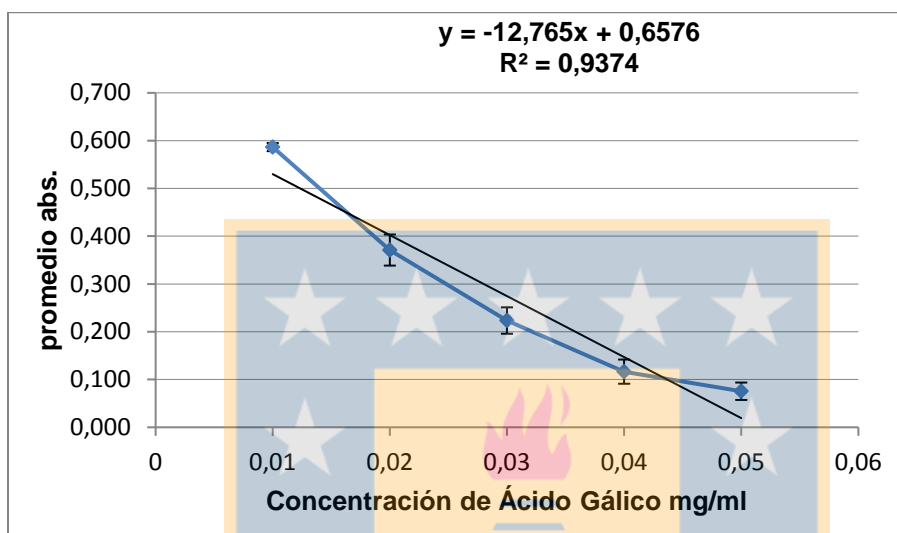


Figura 9. Curva estándar ácido gálico para el ensayo antioxidante con DPPH.

Se pudo observar y establecer en los resultados que 0,560 mg/ml del extracto metanólico de *R. spinosus* equivalen a 0,024; 0,023; 0,023 mg/ml de ácido gálico, por separado.

<p>A</p> $y = - 12,765X + 0,6576$ $0,351 = - 12,765X + 0,6576$ $x = \frac{0,351 - 0,6576}{-12,765}$ <p>X= 0,024</p>	<p>B</p> $y = - 12,765X + 0,6576$ $0,367 = - 12,765X + 0,6576$ $x = \frac{0,367 - 0,6576}{-12,765}$ <p>X=0,022</p>	<p>C</p> $y = - 12,765X + 0,6576$ $0,366 = - 12,765X + 0,6576$ $x = \frac{0,366 - 0,6576}{-12,765}$ <p>X=0,022</p>
---	--	--

Entonces para A

0,024 mg de A. gálico \Rightarrow 560 μ g de extracto

X mg de A. gálico..... \Rightarrow 1000000 μ g de extracto

X = 42,857 mg de A. gálico

Entonces para B y C

0,022 mg de A. gálico \Rightarrow 560 μ g de extracto

X mg de A. gálico..... \Rightarrow 1000000 μ g de extracto

X = 39,285 mg de A. gálico

Finalmente: (42,857gr ácido gálico + 39,285gr ácido gálico + 39,285 gr ácido gálico)/3= 121,427 \pm 2,062 mg de ácido gálico en 1gr de extracto.

6.2.2 Actividad antioxidante frente al radical ABTS^{•+}.

En el ensayo realizado con el radical ABTS^{•+}, se evaluaron las siguientes concentraciones 0.01, 0.04, 0.07, 0.10, 0.13, 0.16, 0.19, 0.22, 0.25, y 0.28 mg/ml, con las cuales se observó una actividad antioxidante positiva del extracto de *R. spinosus*, obteniéndose una disminución de 90,17 % en la concentración más alta 0.28 mg/ml y una mínima actividad de 5,58 % con la concentración de 0.01 mg/ml (Fig. 10) (Anexo 5)

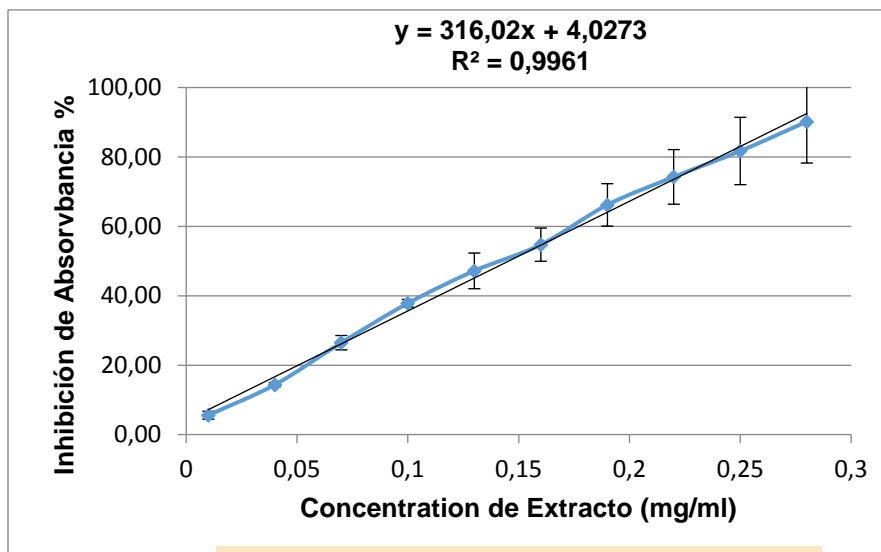


Figura 10. Porcentaje de disminución de absorbancia de ABTS^{•+} a diferentes concentraciones del extracto metanólico de *R.spinossus*.

El cálculo del IC₅₀ se resolvió a partir de la ecuación de la curva, siendo 0,145 mg/ml.

$$y = 316,02X + 4,027$$

$$50 = 316,03X + 4,027$$

$$\frac{50 - 4,0273}{316,02} = X$$

$$X = 0,145 \text{ mg/ml}$$

Según el resultado se obtuvo una correlación positiva ($R^2 = 0,9961$) entre la concentración del extracto acuoso de *R. spinosus* y el porcentaje de disminución del radical catiónico ABTS^{•+}, que nos muestra que a medida que aumenta en la concentración del extracto, también aumenta el porcentaje de inhibición.

6.2.2.1. Efecto de la capacidad antioxidante frente a ABTS^{•+} durante el tiempo.

Se evaluó el efecto antioxidante a través del ensayo de cinética del extracto metanólico de *R. spinosus* mediante el radical catiónico ABTS^{•+}, a una concentración de 0,145 mg/ml (IC₅₀), leyendo la absorbancia cada 5 minutos durante 3 horas, la absorbancia del control negativo fue 0,625 para la cinética 1, 0,647 para la cinética 2 y 0,648 para la cinética 3. Se observó una disminución de la absorbancia al inicio de 0,342 la cual representa el 46,5% de inhibición del radical (Fig. 11). Esta disminución se mantiene en forma gradual hasta finalizar los 180 minutos alcanzando un mínimo de absorbancia de 0,256 que representa el 59,8% de inhibición (Anexo 6).

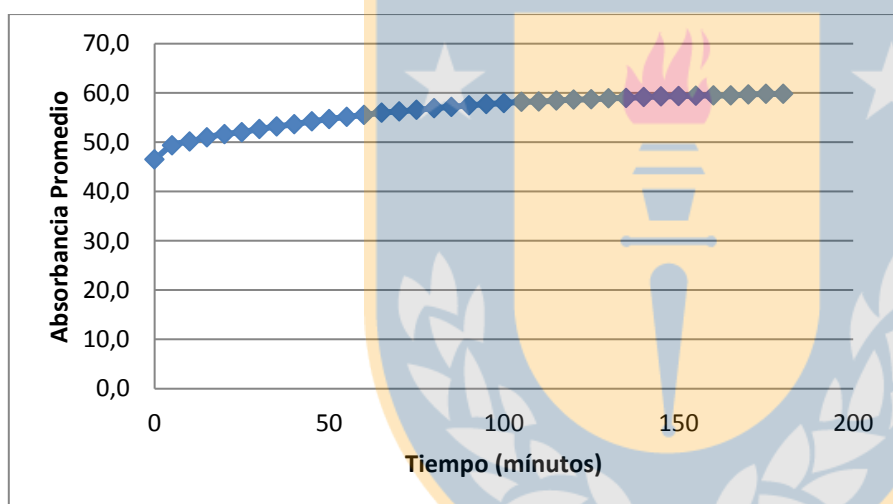


Figura 11. Efecto antioxidante del extracto metanólico de *R. spinosus* en el tiempo en concentración del IC₅₀. Periodo de la cinética es de 3 horas (180 minutos), analizando la muestra cada 5 minutos.

6.2.2.2. Equivalentes de Trolox según ensayo realizado mediante ABTS^{•+}

La determinación de equivalentes de Trolox se llevó a cabo mediante la ecuación de la curva de calibración (Fig. 12) (Anexo 8) desde la absorbancia medida con el extracto metanólico de *R. spinosus* a la concentración de 0,145 mg/ml a 734 nm del extracto de *R. spinosus* en triplicado (Anexo 7).

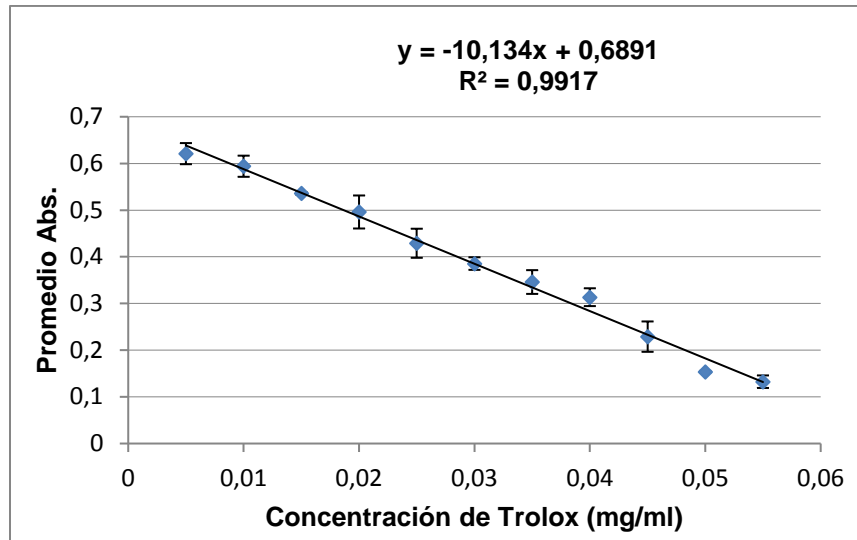


Figura 12. Curva estándar Trolox para el ensayo antioxidante con ABTS^{•+}.

Se pudo observar y establecer en los resultados que 0,145 mg/ml del extracto metanólico de *R. spinosus* equivalen a 0,019; 0,012; 0,016 mg/ml de trolox, por separado.

A	B	C
$y = - 10,134X + 0,6891$	$y = - 10,134X + 0,6891$	$y = - 10,134X + 0,6891$
$0,492 = - 10,134X + 0,6891$	$0,561 = - 10,134X + 0,6891$	$0,521 = - 10,134X + 0,6891$
$x = \frac{0,492 - 0,6891}{-10,134}$	$x = \frac{0,561 - 0,6891}{-10,134}$	$x = \frac{0,521 - 0,6891}{-10,134}$
-10,134	-10,134	-10,134
X= 0,019	X= 0,013	X= 0,017

Entonces para A:

0,019 mg de Trolox \Rightarrow 145 μ g de extracto

X mg de Trolox \Rightarrow 1000000 μ g de extracto

X = 131,034 mg de Trolox

Entonces para B:

0,013 mg de trolox \Rightarrow 145 μ g de Trolox

X mg de Trolox \Rightarrow 1000000 μ g de extracto

X = 89,655 mg de Trolox

Entonces para C:

0,017 mg de Trolox \Rightarrow 145 μ g de extracto

X mg de Trolox \Rightarrow 1000000 μ g de extracto

X = 117,241 mg de Trolox

Finalmente: $(131,034 \text{ gr Trolox} + 89,655 \text{ gr Trolox} + 117,241 \text{ gr Trolox})/3 = 112,643 \pm 24,219 \text{ mg Trolox en 1gr de extracto.}$

6.3 Determinación de polifenoles totales

En la Fig 13 (Anexo 10) se muestra la curva de calibración de ácido gálico utilizada para determinar el contenido de fenoles totales. Se pudo observar y establecer en los resultados de 1 mg/ml del extracto metanólico de *R. spinosus* (Anexo 9) equivalen en 2,7, 1,9, 1,7 μ g/ml de ácido gálico, por separado. Por lo tanto 1000000 μ g (1gr) de extracto metanólico equivalen a 0,3, 0,211, 0,188 gr de ácido gálico respectivamente, con un promedio de 0,233 gr de ácido gálico.

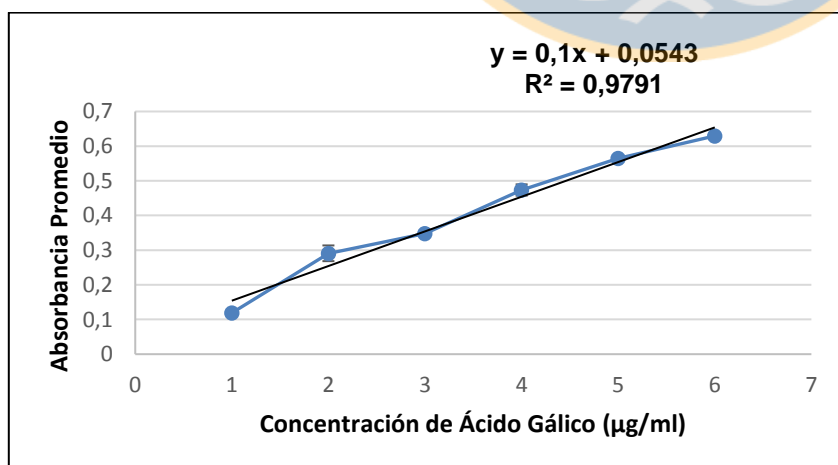


Figura 13. Curva estándar de ácido gálico utilizado en la medición de contenido de fenoles totales.

A	B	C
$y = 0,1X + 0,0543$	$y = 0,1X + 0,0543$	$y = 0,1X + 0,0543$
$0,324 = 0,1X + 0,0543$	$0,253 = 0,1X + 0,0543$	$0,227 = 0,1X + 0,0543$
$x = \frac{0,324 - 0,0543}{0,1}$	$x = \frac{0,253 - 0,0543}{0,1}$	$x = \frac{0,227 - 0,0543}{0,1}$
$X = 2,697$	$X = 1,987$	$X = 1,727$

Entonces para A:

2,697 μg de ácido gálico \Rightarrow 9 μg de extracto
 $X \mu\text{g}$ de ácido gálico \Rightarrow 1000000 μg de extracto
 $X = 299666 \mu\text{g}$ de ácido gálico = 0,300 gr ácido gálico

Entonces para B:

1,987 μg de ácido gálico \Rightarrow 9 μg de extracto
 $X \mu\text{g}$ de ácido gálico \Rightarrow 1000000 μg de extracto
 $X = 220777 \mu\text{g}$ de ácido gálico = 0,221 gr de ácido gálico

Entonces para C:

1,727 μg de ácido gálico \Rightarrow 9 μg de extracto
 $X \mu\text{g}$ de ácido gálico \Rightarrow 1000000 μg de extracto
 $X = 191888 \mu\text{g}$ de ácido gálico = 0,191 gr de ácido gálico

Finalmente: $(0,300 \text{ gr ácido gálico} + 0,221 \text{ gr ácido gálico} + 0,191 \text{ gr ácido gálico})/3 = 0,237 \pm 0,055 \text{ gr de ácido gálico en 1gr de extracto.}$

6.4 Determinación de grupos de metabolitos secundarios.

Tabla 1: Tabla resumen de presencia “+++” y no se detecta presencia “-”

Metabolitos Secundarios	Prueba Química	Resultados
Flavonoides	HCl/Mg o HCl/Zn	-
Taninos	FeCl ₃	-
Cumarinas	H ₂ SO ₄ / UV 366nm	-
Saponinas	Agitación	-
Alcaloides	NH ₃ / Reacción con Lugol	-
Antroquinonas	Reacción Bomtraeger	-
Derivado del núcleo esteroidal	Reacción de Liebermann	+++

6.4.1 Determinación de Derivados del Núcleo Esteroidal

La reacción es positiva ya que la reacción muestra un color verde intenso como es descrito en la literatura.

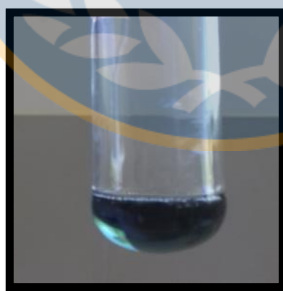


Figura 14. Muestra reacción positiva ya que el resultado es de un color verde intenso.

6.5. Determinación de Flavonoides totales.

La determinación de equivalentes de Catequina se llevó a cabo mediante la ecuación de la curva de calibración (Fig. 15) (Anexo 12) desde la absorbancia medida con el extracto metanólico desde frutos de *R. spinosus* a la concentración de 0,4 mg/ml a 510 nm del extracto metanólico obtenido desde frutos de *R. spinosus* en triplicado (Anexo 11).

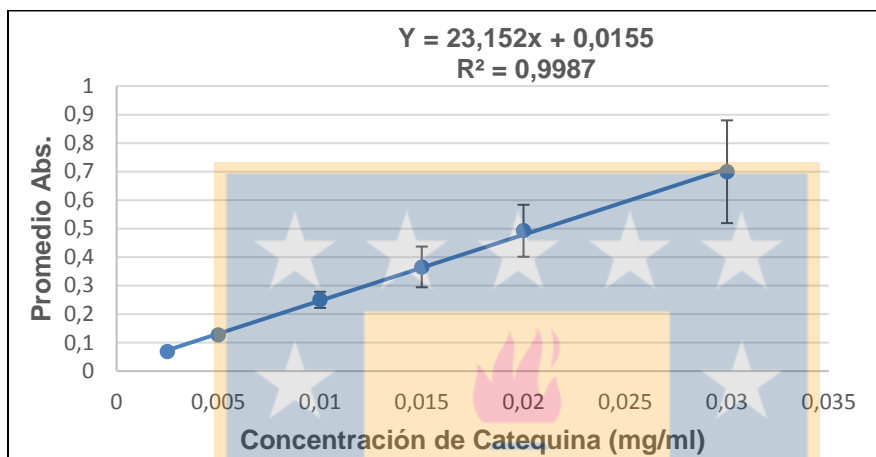


Figura 15. Curva estándar de Catequina utilizado en la medición de contenido de flavonoides totales.

Se pudo observar y establecer en los resultados que 0,4 mg/ml del extracto metanólico desde frutos 2017 de *R. spinosus* almacenados a una temperatura de -4 °C durante un año equivalen a 0,0054; 0,0046; 0,0065 mg/ml de catequina, por separado.

A	B	C
$y = 23,152X + 0,0155$	$y = 23,152X + 0,0155$	$y = 23,152X + 0,0155$
$0,142 = 23,152X + 0,0155$	$0,124 = 23,152X + 0,0155$	$0,168 = 23,152X + 0,0155$
$x = \frac{0,142 - 0,0155}{23,152}$	$x = \frac{0,124 - 0,0155}{23,152}$	$x = \frac{0,168 - 0,0155}{23,152}$
23,152	23,152	23,152

X= 0,00546	X= 0,004680	X= 0,00659
------------	-------------	------------

Entonces para A:

0,00546 μg de Trolox \Rightarrow 400 μg de extracto

X μg de Trolox \Rightarrow 1000000 μg de extracto

X = 13,7 μg de Trolox

Entonces para B:

0,004680 μg de trolox \Rightarrow 400 μg de Trolox

X μg de Trolox \Rightarrow 1000000 μg de extracto

X = 11,7 μg de Trolox

Entonces para C:

0,00659 μg de Trolox \Rightarrow 400 μg de extracto

X μg de Trolox \Rightarrow 1000000 μg de extracto

X = 16,5 μg de Trolox

Finalmente: $(13,7 \text{ gr ácido gálico} + 11,7 \text{ gr ácido gálico} + 16,5 \text{ gr ácido gálico})/3 = 13,966 \pm 2,400 \mu\text{g}$ de ácido gálico en 1gr de extracto

Se pudo observar y establecer en los resultados que 0,4 mg/ml del extracto metanólico desde frutos 2018 de *R. spinosus* equivalen a 0,0060; 0,0068; 0,0064 mg/ml de catequina, por separado.

A	B	C
$y = 23,152X + 0,0155$	$y = 23,152X + 0,0155$	$y = 23,152X + 0,0155$
$0,155 = 23,152X + 0,0155$	$0,173 = 23,152X + 0,0155$	$0,168 = 23,152X + 0,0155$
$x = \frac{0,155 - 0,0155}{23,152}$	$x = \frac{0,173 - 0,0155}{23,152}$	$x = \frac{0,168 - 0,0155}{23,152}$
$X = 0,0060$	$X = 0,0068$	$X = 0,0066$

Entonces para A:

0,0060 μg de Trolox \Rightarrow 400 μg de extracto

X μg de Trolox \Rightarrow 1000000 μg de extracto

X = 15 μg de Trolox

Entonces para B:

0,0068 μg de trolox \Rightarrow 400 μg de Trolox

X μg de Trolox \Rightarrow 1000000 μg de extracto

X = 17 μg de Trolox

Entonces para C:

0,0066 μg de Trolox \Rightarrow 400 μg de extracto

X μg de Trolox \Rightarrow 1000000 μg de extracto

X = 17 μg de Trolox

Finalmente: $(15 \mu\text{g} \text{ ácido gálico} + 17 \mu\text{g} \text{ ácido gálico} + 17 \mu\text{g} \text{ ácido gálico})/3 = 16,333 \mu\text{g} \pm 1$ de ácido gálico en 1gr de extracto

6.6.- Determinación de Actividad Antibacteriana

No se observó inhibición bacteriana a las diferentes concentraciones del extracto metanólico en que se midió este ensayo; tanto para *S. aureus*, como para *E. coli*. Estos resultados se observan en la Fig 16 a una concentración de 200 mg/ml.

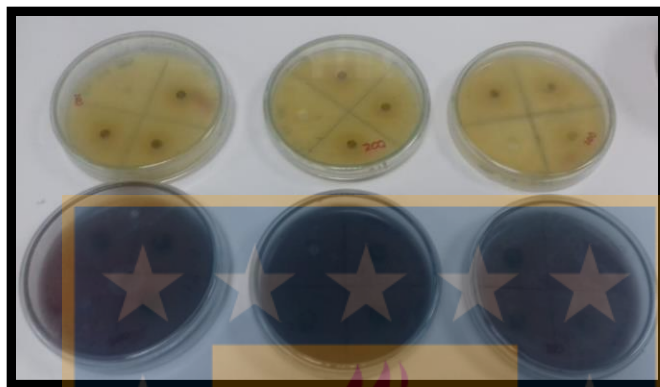


Figura 16: Placas con medio de cultivo EMB-Levine y BAIRD-PARKER, sembrado con cepa de *E. coli* y *S. aureus* a una concentración de 200 mg/ml.

7. DISCUSIÓN

En base a los resultados obtenidos en los ensayos realizados con DPPH se muestra el potencial como antioxidante del extracto metanólico de *R. spinosus* debido a los antioxidantes naturales que posee, los cuales, neutralizan el color característico del DPPH; consecuentemente se observó que su actividad antioxidante perdura a lo largo del tiempo, por lo que se confirma su efecto antioxidante. Además se ha demostrado en este ensayo que el extracto metanólico de *R. spinosus* en hojas y tallos redujo el radical catiónico ABTS•+, y su actividad perdura en el tiempo dado que disminuyó la absorbancia, esto a causa de que el radical se reduce por la facilidad para donar los átomos de hidrogeno desde el polifenol, seguido de una etapa de decrecimiento lento, hasta su equilibrio, esto se debe a la actividad remanente de los productos de oxidación y degradación (Samaniego 2005).

En cuanto a los metabolitos secundarios en el extracto de hojas y tallos de *R. spinosus*, se detectó la presencia de derivados del núcleo esteroidal; los cuales, poseen acción analgésica y antiinflamatoria (Ruiz et al. 2003) siendo estos efectos los utilizados por pueblos ancestrales (Valencia 2013).

Respecto a los resultados de polifenoles, se indicó que el contenido de polifenoles totales se correlaciona con la actividad antioxidante. Según García et al (2010) estos compuestos se relacionan con la capacidad antioxidante pudiendo actuar como captadores de radicales libres por lo que se deduce que a mayor presencia de polifenoles en una planta, mayor será su actividad antioxidante.

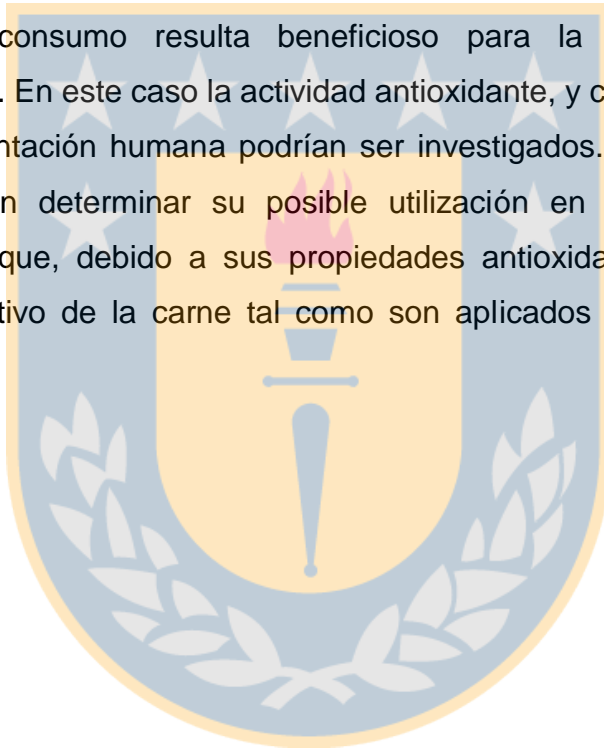
En *R. spinosus* debido a la ausencia de flavonoides y de taninos, y a la presencia de equivalentes de Á. Galico de Trolox y de derivados del núcleo esteroidal, es posible afirmar que el efecto antioxidante es debido a la presencia de los compuestos anteriormente mencionados.

En relación al contenido de flavonoides en el extracto metanólico obtenido desde frutos de *R. spinosus*, este no experimenta una variación significativa en relación al tiempo de almacenamiento, los valores fueron relativamente similares y el

contenido de flavonoides influye directamente con la actividad antioxidante del extracto.

La actividad antibacteriana del extracto se estimó utilizando métodos convencionales empleando las bacterias *Escherichia coli* y *Staphylococcus aureus* (Muhammad et al. 2014). En los resultados obtenidos no se observaron halos de inhibición en ninguno de los dos casos, por lo tanto, el extracto metanólico no posee efecto antibacteriano.

En un futuro, se vislumbran dos posibles usos de este vegetal. Por una parte, manifiesta una de las características de los alimentos funcionales, entendiéndose como aquellos cuyo consumo resulta beneficioso para la salud humana (Valenzuela, et al. 2014). En este caso la actividad antioxidante, y cuyos efectos en el consumo de la alimentación humana podrían ser investigados. Por otra parte, futuros estudios podrían determinar su posible utilización en la industria de productos cárneos, ya que, debido a sus propiedades antioxidantes, permitiría disminuir el daño oxidativo de la carne tal como son aplicados otros vegetales (Valenzuela, 2016).



8. CONCLUSIÓN

Los resultados obtenidos en este estudio mostraron una interesante actividad antioxidante, la que se pudo observar a lo largo del tiempo, debido a compuestos estables que son capaces de eliminar radicales libres, lo que podría ser útil para potenciales aplicaciones en métodos antioxidantes.

La actividad antibacteriana no fue efectiva, ya que no hubo actividad de inhibición en el crecimiento bacteriano.

Con la finalidad de continuar investigando las propiedades de esta planta, se sugiere comprobar su actividad antioxidante mediante el uso de otras técnicas disponibles distintas a las empleadas en estos ensayos (Gülçin, 2012). Esos posibles resultados podrían complementar los ya esbozados hasta el momento.



9 Bibliografía

Agudo L (2010) Técnicas para la determinación de compuestos antioxidante en alimentos. Revista de la educación en Extremadura: 27-34.

Agati G, Azzarello E, Pollastri S, Tattini M, (2012) Flavonoides como antioxidantes en plantas: ubicación y significado funcional. Planta Sci. 196: 67-76

Alam M, Bristi N, Rafiquzzaman M (2012) Review on in vivo and in vitro methods evaluation of antioxidant activity. Saudi Pharmaceutical Journal 21: 143-152.

Avalos A, Pérez E (2009) Metabolismo secundario de plantas. Reduca (Biología), Serie Fisiología Vegetal 2: 119:145

Avello M, Pastene E (2005) Actividad antioxidante de infusos de *Ugni molinae* Turcz ("Murtilla"). Boletín Latinoamericano y del Caribe de Plantas Medicinales y Aromáticas 4: 33-39

Blois M (1958) Antioxidant determinations by the use of a stable free radical. Nature 181: 1199- 1200

Brand-Williams W, Cuvelier M, Berset C (1995) Use of free radical method to evaluate antioxidant activity. Lebensm. Wiss. Technol. 22: 25-30

Coronado M, Vega S, León S, Gutiérrez R, Vázquez M, Radilla C (2015) Antioxidantes: perspectiva actual para la salud humana. Revista Chilena de Nutrición 42: 206-212

Cortez-Echeverría J (2016) Guías de campo de Fray Jorge. Tomo II. Flora: Bosque y Matorral Semiárido. Santiago de Chile. Centro de Estudios Avanzados en Zonas Áridas (CEAZA)

Durazzo A, Casale G, Melini V, Maiani G, Acquistucci R (2015) Evaluation of Antioxidant Properties In Cereals: Study of Some Traditional Italian Wheats. Foods 4: 391-399

Finkel T, Holbrook N (2000) "Oxidants, oxidative stress and the biology of ageing". Nature 408: 239-247.

Frankel E, Waterhouse A, Teissedre P (1995) Principal phenolic phytochemical in selected california wines and their antioxidant activity in inhibiting oxidation of human low-density lipoproteins. J. Agric. Food Chem 43: 890-894

Fredes C (2009) Antioxidantes en berries nativos chilenos. Boletín Latinoamericano y del Caribe de Plantas Medicinales y Aromáticas 8: 469-478

Gajula D, Verghese M, Boateng J, Walker L T, Shackelford L, Mentreddy S R, Cedric S (2009). Determination of total phenolics, flavonoids, and antioxidants and chemopreventive potential of Basil (*Occinum basilicum* and *Occinum teneriflosum*). International Journal of Cancer Research 5: 130-143

Galeano P, Gil M, Otálvaro L, Saéz J. Rojano B (2010). Synthesis and antioxidant activity of two isoespintanol derivatives. Revista Colombiana de Química. 39: 173-180.

García D, Ojeda F, Montejo I (2003) Evaluacion de los principales factores que influyen en la composición fitoquímica de *Morus alba* (Linn.). I Análisis cuantitativo de metabolitos secundarios. Pastos y Forraje 26: 335

García C, Martínez A, Ortega J, Castro F (2010) Componentes químicos y su relación con las actividades biológicas de algunos extractos vegetales. Química Viva. Durango, México 87: 86-96

Gavira C, Ochoa O, Sánchez N, Medina C, Lobo M, Galeano G, Mosquera A, Tamayo A, Lopera Y, Rojano B (2009). Actividad Antioxidante e inhibición de la peroxidación lipídica de extractos de frutos de mortiño (*Vaccinium merionales*). Bol Latinoam Caribe, Plant Med Aromat 8: 510-528.

George N, Obot I, Ikot A, Akpan A, Obi-egdebi A (2010) Phytochemical and antimicrobial Properties of leaves of *Alchonea cordifolia*. E-Journal of Chemistry 7: 1071-1079

Glass C., Witztum J (2001) Atherosclerosis; The road ahead. *Cell* 104: 503-516

Gülçin I (2012) Antioxidant activity of food constituents: an overview. *Archives of Toxicology* 86: 345-391

Halliwell B, Gutteridge J, Cross C (1992) Free radicals, antioxidants, and human disease: where are we now? *J. Lab. Clin. Med.* 119: 598-620

Harborne J, Williams C (2000) Avances en la investigación de los flavonoides desde 1992. *Phytochemistry* 55: 481-504

Imosemi L (2013) The role of antioxidants in cerebellar development. A review of literature. *International Journal of Morphology* 31: 293-210

Kuskoski M, Asuero A, Troncoso A, Mancini-Filho J, Fett R (2005) Aplicación de diversos métodos químicos para determinar actividad antioxidante en pulpa de frutos. *Cienc Tecnol Aliment. Campinas.* 25: 726-732

Lillo A, Carvajal-Caiconte F, Núñez D, Balboa N, Alvear Zamora M (2016) Cuantificación espectrofotométrica de compuestos fenólicos y actividad antioxidante en distintos berries nativos del Cono Sur de América. *Revista de Investigación Agropecuaria* 42: 168- 174

López Y, Angulo M, Martínez C, Soto J, Chaidez C (2007) Efecto antimicrobiano de extractos crudos de neem (*Azadirachta indica* A. Juss) y venadillo (*Swietenia humilis* Zucc) contra *E. coli*, *S. aureus* y el bacteriófago P22. *Bioquímica* 32:117-125

Maldonado O, Jiménez E, Bernabé M, Ceballos G, Méndez E (2010) Radicales libres y su papel en las enfermedades crónico-degenerativas. *Revista Médica de la Universidad Veracruzana* 10: 32-39

Manach C, Scalbert A, Morand C, Remesy C, Jimenez L (2004) Polyphenols: Food sources and bioavailability. *American Journal of Clinical Nutrition* 79: 727-747

Mesa A, Gavirias C, Cardona F, Sáez J, Trujillo S, Rojano B. (2009) Actividad antioxidante y contenido de fenoles totales de algunas especies del género *Calophyllum*. Universidad Nacional de Colombia Sede Medellín. A.A 3840. Medellín, Colombia.

Meza I, Villagrán C (1991) Etnobotánica de la isla Alao, Archipiélago de Chiloé, Chile. Boletín del Museo Nacional de Historia Natural 42: 39-78

Michael J, Carter W (2000) Modeling antimicrobial activity of clorox using an agar-diffusion test: a new twist on an old experiment. Bioscience 23: 9-13

Ministerio de Ambiente, Vivienda y Desarrollo Territorial (2003) Guía para manejo seguro y gestión ambiental de 25 sustancias químicas. Bogotá, D.C. Colombia. Ministerio de Ambiente, Vivienda y Desarrollo Territorial 293

Moldenke H. N. (1937) A monograph of the genus *Rhaphithamnus*. Repertorium specierum Novarum Regni Vegetabilis 42: 62-82

Muhammad I, Nasir R, Komal R, Muhammad Z, Muhammad R, Muhammad ZH, Usman AR, Ayman N, Hawa ZEJ (2014) Composición química y estudios biológicos del *Ficus benjamina*. Chem. Centavo. 8: 12-16

Núñez A (2011) Terapia antioxidante, estrés oxidativo y productos antioxidantes: retos y oportunidades. Rev Cubana Salud Pública 37: 644-660

Obara , Pirce F, Scheuermann E, Spoto M.H.F., Vieira T.M.F.S. (2017) Antioxidant activity and sensory analysis of murtilla (*Ugni molinae* Turcz.) fruit extracts in an oil model system. Grasas y Aceites 68(1)

Osman A. Wong K. Fernyhough A (2006) ABTS radical-driven oxidation of polyphenols: Isolation and structural elucidation of covalent adducts. Biochemical and Biophysical Research Communications 346: 321–329

Parra A, Silva G, Hepp R, Urbina A (2007) Búsqueda de polvos vegetales de árboles nativos con propiedades insecticidas para el control de *Sitophilus zeamais*

Motschulsky. Boletín Latinoamericano y del Caribe de Plantas Medicinales y Aromáticas 6: 413-414

Pavithra G, Saba S, Abhishiktha S, Kekuda T, Vinayaka K (2013) Antioxidant and Antimicrobial Activity of Flowers of *Wendlandia thyrsoides*, *Olea dioica*, *Lagerstroemia speciosa* and *Bombax malabaricum*. Journal of Applied Pharmaceutical Science 3: 114-120

Peña J (2015) *Aristolelia chilensis*: A Possible Nutraceutical or Functional Food. Medicinal Chemistry 5: 378-382

Quintero S, Gioanetto F, Chávez C, Bárcenas O (2001) Curso taller de agricultura orgánica. Universidad Autónoma de Chihuahua: CIDACOM, Chiguagua, México

Re R, Pellegrini N, Proteggente A, Pannala A, Yang M, Rice-Evans C (1999) La actividad antioxidante aplicación de un ensayo de decoloración catión radical ABTS mejorada. Biología y Medicina Free Radical 26:1231-1237

Rebolo S (2007) Estudio de la composición polifenólico de vinos tintos gallegos con DO: Ribeiro, Valdeorras y Ribeira sacra. Tesis Doctoral. Universidad de Santiago de Compostela. España

Rice-Evans C, Miller N, Paganga G (1997) Propiedades antioxidantes de compuestos fenólicos. Trends Plant Sci. 2: 152-159

Ruiz R, Silva R, Ruiz S (2003) Aislamiento de esteroides, Bases de amonio y saponinas de *Amaranthus muricatus* (Moquin) Gillies ex Hicken (Amaranthaceae). Acta Farm. Bonaerense 22: 101-104

Samaniego S (2005) Estudio y evaluación de la capacidad antioxidante de aceite de oliva virgen extra. Implicación en la salud. Tesis Doctoral. Universidad de Granada. España

Singleton V, Orthofer R, Lamuela R (1999) Analisis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of Folin-Ciocalteu reagent. *Methods Enzymo.* 299: 152-178

Sirikantaramas S, Yamazaki M, Saito K (2008) Mechanisms of resistance to self-produced toxic secondary metabolites in plants. *Phytochem.* 7: 467

Soberón M, Bravo A (2007) Las toxinas Cry de *Bacillus thuringiensis*: modo de acción y consecuencias de su aplicación. *Biotecnología* 14: 303–314

Tovar J (2013) **Determinación de la actividad antioxidante por DPPH y ABTS** de 30 plantas recolectadas en la ecoregión cafetera. Tesis de grado para optar al título de Químico Industrial. Universidad tecnológica de Pereira, Colombia

Ulloa-Inostroza E M, Ulloa-Inostroza E G, Alberdi M, Peña-Sanhueza D, González-Villagra J, Jaakola L, Reyes-Días M (2017) Native Chilean Fruits and the effects of their functional compounds on human health. *Superfood and functional food* Waisundara V, Shiomi N. *IntetchOpen*

Urquiaga I, Echeverria G, Dussaillant C, Rigotti A (2017) Origen, componentes y posibles mecanismos de acción de la dieta mediterránea. *Revista Médica de Chile* 145: 89-95

Valencia E (2013) **Validación y actualización del uso** de plantas medicinales presentes en la selva valdiviana. Tesis de grado para optar al Título de Químico Farmacéutico. Universidad Austral de Chile

Valenzuela A, Valenzuela R, Sanhueza J, Morales G (2014) Alimentos funcionales, nutraceuticos y foshu: ¿vamos hacia un nuevo concepto de alimentación? *Revista chilena de Nutrición* 41:198-204

Valenzuela C, Pérez P (2016) Actualización en el uso de antioxidantes naturales derivados de frutas y verduras para prolongar la vida útil de la carne y productos cárneos. *Revista chilena de Nutrición* 43(2):188-195

Van der Sluis A, M Dekker, Jongen W (1997) Flavonoids como componentes bioactivos en productos de manzana. *Cáncer Lett.* 114: 107-108

Wilhelm de Môsbach (1992) Botánica indígena de Chile. *Andres Bello. Chile* 82: 1 - 141

Williamson G, Day A, Plumb G, Couteau D (2000) Vías metabólicas humanas de los flavonoides y cinamatos en la dieta. *Biochem. Soc. Trans.* 28: 16-22

Wilson D, Nash P, Singh H, Griffiths K, Singh R, D Meester F, Horiuchi R, Takashi T (2017) The role of food antioxidants, benefits of functional foods, and Influence of feeding habits on the health of the older person: An overview. *Antioxidants* 6: 81

Yuan H, Gong A, Young C (2005) Involvement of transcription factor Sp1 in quercetin-mediated inhibitory effect on the androgen receptor in human prostate cancer cells. *Carcinogenesis* 26: 793-801

Zapata K, Cortes F, Rojano B (2013) Polifenoles y Actividad Antioxidante del Fruto de Guayaba Agria (*Psidium araca*). *Universidad Nacional de Colombia, Sede Medellín. Medellín – Colombia* 24: 103-112

ANEXOS

Anexo 1: Detalle de las absorbancia del ensayo antioxidante con radical libre DPPH y valores del porcentaje de Inhibición de DPPH (en triplicado).

DPPH	0,816	0,859	0,748
DPPH+Metanol	0,747	0,796	0,711
Blanco	Metanol	Metanol	Metanol

mg/ml	A1	A2	A3	% Inh. R1	% Inh. R2	% Inh. R3	Promedio %	Desviación Estándar
0,05	0,706	0,726	0,670	5,49	8,79	5,77	6,68	1,83
0,20	0,601	0,625	0,571	19,54	21,48	19,69	20,24	1,08
0,35	0,478	0,519	0,438	36,01	34,80	38,40	36,40	1,83
0,50	0,411	0,463	0,320	44,98	41,83	54,99	47,37	6,87
0,65	0,274	0,321	0,216	63,32	59,67	69,62	64,20	5,03
0,80	0,185	0,234	0,138	75,23	70,60	80,59	75,48	5,00
0,95	0,140	0,156	0,100	81,26	80,40	85,94	82,53	2,98
1,10	0,056	0,062	0,091	92,50	92,21	87,20	90,64	2,98
1,25	0,018	0,027	0,087	97,59	96,61	87,76	93,99	5,41
1,40	0,007	0,002	0,082	99,06	99,75	88,47	95,76	6,32

Anexo 2: Medidas en detalle de las absorbancia obtenida en mediciones por triplicado, del ensayo antioxidante con radical libre DPPH.

	A1	A2	A3
Control Negativo	0,803	0,765	0,769
DPPH	0,858	0,836	0,851

Tiempo (min)	A1	A2	A3	Promedio	%R1	%R2	%R3	Promedio %
0	0,243	0,362	0,448	0,351	69,738	52,680	41,743	54,7
5	0,192	0,332	0,412	0,312	76,090	56,601	46,424	59,7
10	0,166	0,312	0,393	0,290	79,328	59,216	48,895	62,4
15	0,146	0,294	0,378	0,273	81,818	61,569	50,845	64,7
20	0,128	0,279	0,365	0,257	84,060	63,529	52,536	66,7
25	0,112	0,264	0,353	0,243	86,052	65,490	54,096	68,5
30	0,099	0,249	0,341	0,230	87,671	67,451	55,657	70,2

35	0,087	0,234	0,329	0,217	89,166	69,412	57,217	71,9
40	0,078	0,22	0,318	0,205	90,286	71,242	58,648	73,3
45	0,071	0,205	0,306	0,194	91,158	73,203	60,208	74,8
50	0,067	0,191	0,294	0,184	91,656	75,033	61,769	76,1
55	0,063	0,177	0,283	0,174	92,154	76,863	63,199	77,4
60	0,061	0,164	0,271	0,165	92,403	78,562	64,759	78,5
65	0,058	0,15	0,26	0,156	92,777	80,392	66,190	79,7
70	0,056	0,137	0,249	0,147	93,026	82,092	67,620	80,9
75	0,055	0,125	0,238	0,139	93,151	83,660	69,051	81,9
80	0,054	0,113	0,227	0,131	93,275	85,229	70,481	82,9
85	0,053	0,101	0,216	0,123	93,400	86,797	71,912	84,0
90	0,052	0,091	0,206	0,116	93,524	88,105	73,212	84,9
95	0,051	0,081	0,197	0,110	93,649	89,412	74,382	85,8
100	0,05	0,073	0,187	0,103	93,773	90,458	75,683	86,6
105	0,049	0,066	0,178	0,098	93,898	91,373	76,853	87,3
110	0,049	0,06	0,170	0,093	93,898	92,157	77,893	87,9
115	0,049	0,056	0,162	0,089	93,898	92,680	78,934	88,5
120	0,048	0,053	0,154	0,085	94,022	93,072	79,974	89,0
125	0,048	0,05	0,146	0,081	94,022	93,464	81,014	89,5
130	0,048	0,048	0,139	0,078	94,022	93,725	81,925	89,9
135	0,048	0,046	0,132	0,075	94,022	93,987	82,835	90,3
140	0,047	0,044	0,126	0,072	94,147	94,248	83,615	90,6
145	0,047	0,043	0,120	0,070	94,147	94,379	84,395	90,9
150	0,047	0,042	0,115	0,068	94,147	94,510	85,046	91,2
155	0,047	0,042	0,109	0,066	94,147	94,510	85,826	91,5
160	0,047	0,041	0,105	0,064	94,147	94,641	86,346	91,7
165	0,047	0,041	0,100	0,063	94,147	94,641	86,996	91,9
170	0,047	0,040	0,096	0,061	94,147	94,771	87,516	92,1
175	0,047	0,040	0,093	0,060	94,147	94,771	87,906	92,2
180	0,047	0,040	0,089	0,059	94,147	94,771	88,427	92,4

Anexo 3: Mediciones de la curva de ácido gálico para la calibración del ensayo antioxidante con DPPH.

[]mg/ml	A1	A2	Promedio	Desviación estándar
0,01	0,563	0,610	0,587	0,0325
0,02	0,394	0,348	0,371	0,0276
0,03	0,237	0,210	0,224	0,0254
0,04	0,124	0,109	0,117	0,0182
0,05	0,085	0,066	0,076	0,0163

Anexo 4: Mediciones de absorbancia de DPPH en la concentración del extracto metanólico *R. spinosus* para determinar equivalentes de ácido gálico.

Concentración de extracto (mg/ml)	A1	A2	A3	Promedio	Desviación estándar
0,560	0,351	0,367	0,366	0,361	0,00896289

Anexo 5: Detalle de las absorbancia del ensayo antioxidante con radical catiónico ABTS•+ y valores del porcentaje de Inhibición de ABTS (en triplicado).

ABTS•+	0,706	0,691	0,693
ABTS+Metanol	0,694	0,631	0,643
Blanco	Metanol	Metanol	Metanol

mg/ml	A1	A2	A3	%Inh.R1	%Inh.R2	%Inh.R3	Promedio %	Desviación estándar
0,01	0,655	0,603	0,600	5,62	4,44	6,69	5,58	1,13
0,04	0,591	0,539	0,555	14,84	14,58	13,69	14,37	0,61
0,07	0,524	0,465	0,459	24,50	26,31	28,62	26,47	2,07
0,10	0,429	0,400	0,394	38,18	36,61	38,72	37,84	1,10
0,13	0,405	0,304	0,334	41,64	51,82	48,06	47,17	5,15
0,16	0,348	0,256	0,290	49,86	59,43	54,90	54,73	4,79
0,19	0,273	0,172	0,224	60,66	72,74	65,16	66,19	6,10
0,22	0,223	0,107	0,181	67,87	83,04	71,85	74,25	7,87
0,25	0,197	0,057	0,112	71,61	90,97	82,58	81,72	9,71
0,28	0,163	0,028	0,010	76,51	95,56	98,44	90,17	11,92

Anexo 6: Medidas en detalle de las absorbancia obtenida en mediciones por triplicado, del ensayo antioxidante con radical cationico ABTS**.

	A1	A2	A3
ABTS**	0,682	0,704	0,707
Control Negativo	0,625	0,647	0,648

Tiempo (min)	A1	A2	A3	Promedio	%R1	%R2	%R3	Promedio %
0	0,347	0,324	0,356	0,342	44,480	49,923	45,062	46,5
5	0,335	0,301	0,335	0,324	46,400	53,478	48,302	49,4
10	0,33	0,302	0,325	0,319	47,200	53,323	49,846	50,1
15	0,319	0,303	0,318	0,313	48,960	53,168	50,926	51,0
20	0,314	0,303	0,311	0,309	49,760	53,168	52,006	51,6
25	0,312	0,302	0,306	0,307	50,080	53,323	52,778	52,1
30	0,309	0,299	0,3	0,303	50,560	53,787	53,704	52,7
35	0,307	0,296	0,295	0,299	50,880	54,250	54,475	53,2
40	0,305	0,292	0,292	0,296	51,200	54,869	54,938	53,7
45	0,304	0,287	0,287	0,293	51,360	55,641	55,710	54,2
50	0,303	0,283	0,283	0,290	51,520	56,260	56,327	54,7
55	0,302	0,279	0,279	0,287	51,680	56,878	56,944	55,2
60	0,302	0,275	0,276	0,284	51,680	57,496	57,407	55,5
65	0,301	0,271	0,272	0,281	51,840	58,114	58,025	56,0
70	0,302	0,268	0,269	0,280	51,680	58,578	58,488	56,2
75	0,302	0,264	0,267	0,278	51,680	59,196	58,796	56,6

80	0,302	0,26	0,264	0,275	51,68 0	59,81 5	59,25 9	56,9
85	0,302	0,257	0,262	0,274	51,68 0	60,27 8	59,56 8	57,2
90	0,303	0,254	0,258	0,272	51,52 0	60,74 2	60,18 5	57,5
95	0,304	0,25	0,256	0,270	51,36 0	61,36 0	60,49 4	57,7
100	0,305	0,247	0,254	0,269	51,20 0	61,82 4	60,80 2	57,9
105	0,306	0,244	0,251	0,267	51,04 0	62,28 7	61,26 5	58,2
110	0,308	0,242	0,25	0,267	50,72 0	62,59 7	61,42 0	58,2
115	0,309	0,239	0,248	0,265	50,56 0	63,06 0	61,72 8	58,4
120	0,31	0,236	0,246	0,264	50,40 0	63,52 4	62,03 7	58,7
125	0,313	0,234	0,244	0,264	49,92 0	63,83 3	62,34 6	58,7
130	0,314	0,231	0,242	0,262	49,76 0	64,29 7	62,65 4	58,9
135	0,316	0,229	0,24	0,262	49,44 0	64,60 6	62,96 3	59,0
140	0,318	0,226	0,238	0,261	49,12 0	65,07 0	63,27 2	59,2
145	0,32	0,224	0,237	0,260	48,80 0	65,37 9	63,73 5	59,3
150	0,322	0,221	0,235	0,259	48,48 0	65,84 2	63,73 5	59,4
155	0,324	0,219	0,233	0,259	48,16 0	66,15 1	64,04 3	59,5
160	0,326	0,217	0,232	0,258	47,84 0	66,46 1	64,19 8	59,5
165	0,329	0,215	0,231	0,258	47,36 0	66,77 0	64,35 2	59,5
170	0,33	0,213	0,228	0,257	47,20 0	67,07 9	64,81 5	59,7
175	0,332	0,21	0,227	0,256	46,88 0	67,54 3	64,96 9	59,8
180	0,334	0,209	0,226	0,256	46,56 0	67,69 7	65,12 3	59,8

Anexo 7: Mediciones de absorbancias de ABTS⁺, del extracto metanólico de *R. spinosus* para determinar equivalentes de Trolox.

[] Extracto (mg/ml)	A1	A2	A3	Promedio	Desviación estándar
0,145	0,492	0,561	0,521	0,525	0,034

Anexo 8: Mediciones de la curva de Trolox para la calibración del ensayo antioxidante con ABTS⁺.

[] mg/ml	A1	A2	Promedio	Desviación estándar
0,005	0,637	0,605	0,621	0,02262742
0,010	0,610	0,578	0,594	0,02262742
0,015	0,534	0,538	0,536	0,00282843
0,020	0,521	0,471	0,496	0,03535534
0,025	0,451	0,407	0,429	0,0311127
0,030	0,395	0,376	0,3855	0,01343503
0,035	0,364	0,328	0,346	0,02545584
0,040	0,327	0,300	0,3135	0,01909188
0,045	0,206	0,252	0,229	0,03252691
0,050	0,152	0,155	0,1535	0,00212132
0,055	0,142	0,123	0,1325	0,01343503

Anexo 9: Mediciones de absorbancias del extracto metanólico de *R. spinosus* para determinar equivalentes de ácido gálico.

[] Extracto(mg/ml)	A1	A2	A3	Promedio	Desviación estándar
0,009	0,324	0,253	0,227	0,268	0,05020956

Anexo 10: Mediciones de la curva estándar de ácido gálico utilizada en la determinación de fenoles totales.

[] µg/ml	A1	A2	Promedio	Desviación estándar
0	0	0	0	0
1	0,103	0,135	0,119	0,02262742
2	0,295	0,287	0,291	0,00565685
3	0,336	0,359	0,3475	0,01626346
4	0,479	0,468	0,4735	0,00777817
5	0,559	0,57	0,5645	0,00777817
6	0,627	0,632	0,6295	0,00353553

Anexo 11: Mediciones de absorbancias del extracto metanólico desde frutos 2017 y 2018 respectivamente de *R. spinosus* para determinar equivalentes de catequina.

[.]Extracto (mg/ml)	A1	A2	A3	Promedio	Desviación estándar
0,4	0,142	0,124	0,168	0,145	0,022121
0,4	0,155	0,173	0,168	0,165	0,009292

Anexo 12. Mediciones de la curva estándar de catequina utilizada en la determinación de flavonoides totales.

[] (mg/ml)	A1	A2	Promedio	Desviación estándar
0,0025	0,061	0,076	0,0685	0,0106066
0,005	0,117	0,137	0,127	0,01414214
0,01	0,23	0,27	0,25	0,02828427
0,015	0,315	0,416	0,3655	0,07141778
0,02	0,428	0,557	0,4925	0,09121677
0,03	0,572	0,827	0,6995	0,18031223