



Fenoles y flavonoides totales y actividad antioxidante de extractos de hojas de *Lampaya medicinalis* F. Phil.

[Total phenols and flavonoids and antioxidant activity of *Lampaya medicinalis* F. Phil. leaf extracts]

Gabino Garrido*, Macarena Ortiz, Patricia Pozo

Departamento de Ciencias Farmacéuticas, Facultad de Ciencias, Universidad Católica del Norte, Angamos 0610, Antofagasta, Chile.

* E-mail: ggarridog@ucn.cl

Abstract

Context: *Lampaya medicinalis* F. Phil. (Verbenaceae) is a plant that grows in northern of Chile and it is used in ethnomedicine to treat bone pain, as an analgesic, in kidney ailments, disorders of the prostate, liver disease and dyspepsia, although there are few scientific studies about it.

Aims: To determine the antioxidant activity of different extracts from leaves of *L. medicinalis*.

Methods: Extractive methods were performed in water and methanol maceration, decoction and infusion from leaves of *L. medicinalis*. Phenols and flavonoids were measured and evaluated the total antioxidant capacity *in vitro* by discoloration radical 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH) and inhibition of the enzyme xanthine oxidase (XO).

Results: The *L. medicinalis* extract, obtained by maceration in methanol (LM-M), showed higher concentrations of phenols (5807.9 ± 340.0 mg of gallic acid equivalents/100 g dry sample), while the decoction (LM-Dx) showed higher concentration flavonoids (136.0 ± 5.5 mg of quercetin equivalents/100 g dry sample) with statistically significant differences ($p < 0.05$) relative to the other extracts. Moreover, the best results for the DPPH method were to the extracts LM-M and LM-Dx ($IC_{50} = 24.9 \pm 3.6$ and 24.1 ± 2.7 $\mu\text{g/mL}$, respectively), without significant differences between them ($p > 0.05$). However, extracts had no activity on XO.

Conclusions: Polar extracts from leaves of *L. medicinalis* show antioxidant activity due to the presence of flavonoids and phenols that could justify the ethnomedical use of the plant in pathologies transiting by a component of oxidative stress.

Keywords: Lampayo; DPPH; xanthin oxydase; total phenols; total flavonoids.

Resumen

Contexto: *Lampaya medicinalis* F. Phil. (Verbenaceae) es una planta que crece en el norte de Chile y se utiliza en la etnomedicina para tratar los dolores de hueso, como analgésico, en padecimientos renales o de la próstata, afecciones hepáticas y dispepsias, aunque presenta pocos estudios científicos.

Objetivos: Determinar la actividad antioxidante de diferentes extractos de las hojas de *L. medicinalis*.

Métodos: Se realizaron métodos extractivos de maceración en agua y metanol, decocción e infusión de las hojas de *L. medicinalis*. Se determinaron fenoles y flavonoides totales y se evaluó la capacidad antioxidante *in vitro*, mediante la decoloración del radical 1,1-difenil-2-picrilhidracilo (DPPH) y la inhibición de la enzima xantina oxidasa (XO).

Resultados: El extracto de *L. medicinalis*, obtenido por maceración en metanol (LM-M), presentó mayor concentración de fenoles (5807.9 ± 340.0 mg equivalentes de ácido gálico/100 g muestra seca), mientras que la decocción (LM-Dx) presentó mayor concentración de flavonoides (136.0 ± 5.5 mg equivalentes de quercetina/100 g muestra seca) con diferencias estadísticamente significativas ($p < 0.05$) en relación con los demás extractos. Por otra parte, los mejores resultados para el método de DPPH fueron de los extractos LM-M y LM-Dx ($CI_{50} = 24.9 \pm 3.6$ y 24.1 ± 2.7 $\mu\text{g/mL}$, respectivamente), sin presentar diferencias significativas entre ellos ($p > 0.05$). Sin embargo, ningún extracto tuvo actividad sobre XO.

Conclusiones: Los extractos polares de las hojas de *L. medicinalis* muestran actividad antioxidante debido a la presencia de fenoles y flavonoides que podrían justificar el uso etnológico de la planta en patologías que transitan por un componente de estrés oxidativo.

Palabras Clave: Lampayo; DPPH; xantina oxidasa; fenoles totales; flavonoides totales.

ARTICLE INFO

Received | Recibido: Agosto 3, 2013.

Received in revised form | Recibido en forma corregida: Septiembre 13, 2013.

Accepted | Aceptado: Septiembre 24, 2013.

Available Online | Publicado en Línea: Octubre 30, 2013

Declaration of interests | Declaración de Intereses: Los autores declaran no tener conflicto de interés.

Funding | Financiación: Este trabajo fue financiado por el Proyecto UCN3315-2010 y Facultad de Ciencias, Universidad Católica del Norte.



This is an open access article distributed under the terms of a Creative Commons Attribution-Non-Commercial-No Derivative Works 3.0 Unported Licence. (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/3.0/>) which permits to copy, distribute and transmit the work, provided the original work is properly cited. You may not use this work for commercial purposes. You may not alter, transform, or build upon this work. Any of these conditions can be waived if you get permission from the copyright holder. Nothing in this license impairs or restricts the author's moral rights.

Este es un artículo de Acceso Libre bajo los términos de una licencia "Creative Commons Atribución-No Comercial-No trabajos derivados 3.0 Internacional" (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/3.0/deed.es>) Usted es libre de copiar, distribuir y comunicar públicamente la obra bajo las condiciones siguientes: **Reconocimiento.** Debe reconocer los créditos de la obra de la manera especificada por el autor o el licenciador (pero no de una manera que sugiera que tiene su apoyo o apoyan el uso que hace de su obra). **No comercial.** No puede utilizar esta obra para fines comerciales. **Sin obras derivadas.** No se puede alterar, transformar o generar una obra derivada a partir de esta obra. Al reutilizar o distribuir la obra, tiene que dejar bien claro los términos de la licencia de esta obra. Alguna de estas condiciones puede no aplicarse si se obtiene el permiso del titular de los derechos de autor Nada en esta licencia menoscaba o restringe los derechos morales del autor.

INTRODUCCIÓN

Lampaya medicinalis F. Phil. (Fig. 1) es una planta endémica del norte de Chile, conocida vulgarmente como lampaya o lampayo por los habitantes de las regiones de Arica y Parinacota, Tarapacá y Antofagasta. Estudios etnomédicos refieren la utilización de sus flores violáceas como "refrescantes". Las hojas son utilizadas como infusión para dolores de hueso, como analgésico, en padecimientos renales y afecciones a la próstata. Sin embargo, esta especie no posee estudios que confirmen sus propiedades, ya que solo es utilizada por tradición, de acuerdo a los habitantes de la localidad, quienes la consideran una planta de gran valor medicinal (Villagrán et al., 2003; Ministerio de Salud, 2009).



Foto: M. Arenas

Figura 1. Especie *Lampaya medicinalis*.

Por otra parte, las condiciones climáticas y geográficas que presenta la macrozona norte de Chile son propicias para el crecimiento de una flora adaptada a una extrema aridez, fuerte radiación solar y baja humedad relativa. Es por ello que estas plantas deben producir metabolitos secundarios adecuados para sobrevivir en este medio. Por ejemplo, la radiación UV, presente en la zona, activa mecanismos de defensa similares a los que estas especies desarrollan frente a un ataque de patógenos, por lo que la radiación UV-B activaría procesos de lipoperoxidación en la membrana plasmática de estos individuos (Green y Fluhr, 1995; Mackerness et al., 2001).

Uno de los posibles mecanismos de adaptación a la radiación UV-B es el aumento de la producción de metabolitos secundarios tales como fenoles y flavonoides, que absorben radiación

entre los 280-360 nm, se acumulan preferentemente en las células de la epidermis, absorben la radiación UV-B no interfiriendo en la absorción de la radiación fotosintéticamente activa y reducen el efecto deletéreo de dicha radiación sobre los distintos componentes celulares (Bassman, 2004; Carrasco-Rios, 2009).

Además de las propiedades organolépticas que poseen estos compuestos sobre los vegetales, contribuyendo con el color, sabor amargo, astringencia y aroma, presentan diferentes propiedades en el organismo humano, tales como: antioxidantes, antiinflamatorias, antitrombóticas, antimicrobianas, antialérgicas, antitumorales y antiasmáticas, entre otras. Sin embargo, son numerosos los estudios que han mostrado la propiedad antioxidante, principalmente (Pérez, 2003). Uno de los grupos más estudiados dentro de los compuestos fenólicos ha sido el de los flavonoides, debido a su distribución numerosa y a su actividad antioxidante elevada, siendo el subgrupo de los flavonoles el más estudiado.

La actividad antioxidante de los flavonoides resulta de una combinación de sus propiedades quelantes de hierro y secuestradoras de especies reactivas del oxígeno (ERO), además de la inhibición de enzimas, tales como: lipoxigenasa, ciclooxigenasa, mieloperoxidasa y NADPH oxidasa; evitando así la formación de ERO e hidroxiperóxidos orgánicos. También se ha visto que flavonoides como catequina, epicatequina, epigallocatequina, epicatequina galato y epigallocatequina galato reducen la producción de radicales libres por inhibición de la xantina oxidasa (XO), enzima que cataliza la oxidación de hipoxantina y xantina a ácido úrico (Dörner et al., 2006).

En el presente estudio se realizaron diferentes extracciones de las hojas de *L. medicinalis*, las que fueron sometidas a una cromatografía en capa fina (CCF), para identificar los principales metabolitos secundarios; así como se determinaron fenoles y flavonoides totales a cada extracto y la actividad antioxidante *in vitro*, mediante el método de decoloración del radical 1,1-difenil-2-picrilhidracilo (DPPH) y la inhibición de la enzima xantina oxidasa.

MATERIALES Y MÉTODOS

Material vegetal

El material vegetal fue recolectado en la Región de Antofagasta, localidad de Turi (S: 22° 11.962' W: 68° 19.601' Altura: 3077 metros s.n.m.), en Marzo de 2011. Una muestra testigo fue autenticada y depositada en el herbario de la Universidad de Chile con el código 22.467.

Preparación de los extractos

Las hojas de *L. medicinalis* se secaron a temperatura ambiente hasta peso constante. Posteriormente, estas fueron separadas de sus tallos y molidas en picadora 1, 2, 3 (Moulinex, Francia).

El material vegetal fue extraído con metanol o agua hasta agotamiento del material, con agitación orbital constante (70 r.p.m.), durante 5 días. Paralelamente, se realizaron extracciones por infusión (material vegetal en agua entre 80-90°C, durante 10 min) y decocción (material vegetal en agua hirviendo a 100°C durante 10 min). La relación droga:disolvente siempre fue 1:10.

Posteriormente, los extractos fueron filtrados mediante papel filtro Whatman N° 1 y puestos en placas de Petri. El secado se llevó a cabo mediante una corriente de aire caliente (temperatura menor de 50°C). Los extractos secos se mantuvieron en desecadora hasta que tuvieran pesos constantes, con la finalidad de determinar el rendimiento de cada uno de ellos mediante la fórmula siguiente:

$$\% \text{ Rendimiento} = [\text{ES}(\text{g}) \cdot 100] / \text{M}(\text{g})$$

donde: ES = masa del extracto seco y M = masa del material vegetal de partida.

Los extractos se mantuvieron entre 4-8°C hasta su uso.

Caracterización química cualitativa de los extractos

La detección de metabolitos secundarios se efectuó en los extractos metanólico, acuoso, infusión y decocción por cromatografía en capa fina (CCF) en gel de sílice 60 F254 (Merck), y como eluyente se utilizaron mezclas de acetato de etilo: ácido fórmico: ácido acético: agua (100:11:11:26) y n-

butanol: acetato de etilo: amoníaco: agua (12:8:1:2). Las placas cromatográficas se revelaron por aspersión de los reactivos NP (ácido 2-amino-etil éster difenilbórico al 1% en metanol, p/v) o p-anisal-dehído sulfúrico y calor a 100°C por 5 minutos. Las placas se visualizaron a la luz visible o a la UV a una longitud de onda de 365 nm.

Reactivos

1,1-Difenil-2-picrilhidrazilo (DPPH), 2-aminoetil difenil borato (NP), ácido gálico, butilhidroxianisol (BHA), dimetilsulfóxido (DMSO) y reactivo de Folin-Ciocalteu (FC) fueron obtenidos de Merck (Darmstadt, Alemania), ácido etilendiaminotetraacético (EDTA), alopurinol, xantina, xantina oxidasa de Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, EE.UU.). Los demás reactivos y disolventes fueron de grado analítico.

Determinación de fenoles y flavonoides totales

Para determinar el contenido de fenoles totales se realizó una curva de calibración con concentraciones de 10, 50, 100, 150, 250 y 500 mg/L preparadas a partir de una disolución stock de ácido gálico (AG) 5 g/L. Posteriormente, se utilizaron 10 µL de la concentración a ensayar, para adicionarle 790 µL de agua destilada y 50 µL de reactivo FC (1 N). La mezcla se homogeneizó y se pre-incubó por cinco minutos. A continuación, se adicionaron 150 µL de una disolución de carbonato de sodio al 20%, para luego homogeneizar la mezcla e incubarla durante dos horas a temperatura ambiente, protegida de la luz. Finalmente, se procedió a medir la absorbancia de la muestra a 765 nm en un espectrofotómetro UV-Visible (Shimadzu, UV-1700 PharmaSpec, Japón). Esta medición se realizó contra un blanco, en el cual se sustituyó el volumen de la concentración de ácido gálico utilizada por 10 µL de agua destilada.

Para realizar el análisis de las muestras, se procedió a reconstituir cada extracto con su disolvente de origen a una concentración de 1 mg/mL. Posteriormente, a 10 µL de extracto reconstituido se le sometió al mismo tratamiento que a la curva de calibración, diferenciándose únicamente el blanco, en el cual se sustituyó el

volumen de extracto reconstituido por 10 µL de disolvente de origen. Los ensayos fueron realizados por triplicado y los resultados fueron expresados en equivalentes de ácido gálico (mg EAG/100 g de muestra seca).

Para analizar el contenido de flavonoides totales se realizó una curva de calibración con concentraciones de 1; 6,25; 12,5; 25; 50 y 100 µg/mL de quercetina, preparadas a partir de una disolución stock de 0,27 mg/mL, en etanol 80%, de acuerdo a Chang et al. (2002). Posteriormente, a 100 µL de la concentración a ensayar, se le adicionaron 300 µL de etanol 95%, 20 µL de una disolución de nitrato de aluminio 10%, 20 µL de una disolución de acetato de potasio (1 M) y 560 µL de agua destilada. Luego se homogeneizó la mezcla y se dejó incubar por 30 minutos a temperatura ambiente, protegida de la luz. Finalmente, se procedió a medir la absorbancia de la muestra a 415 nm en un espectrofotómetro UV-Visible (Shimadzu, UV-1700 PharmaSpec, Japón). Esta medición se realizó contra un blanco, en el cual se sustituyó el nitrato de aluminio por agua destilada.

Para realizar el análisis de las muestras, se procedió a reconstituir los extractos con etanol 80% (1 mg/mL). Posteriormente, a 100 µL de extracto se le sometió al mismo tratamiento que a la curva de calibración. Los ensayos fueron realizados por triplicado y los resultados fueron expresados en equivalentes de quercetina (mg EQ/100 g de muestra seca).

Evaluación *in vitro* de la capacidad antioxidante

Ensayo de decoloración del radical 1,1- difenil-2-picrilhidracilo (DPPH)

Se preparó una disolución de trabajo de DPPH 20 mg/L. Además, se prepararon disoluciones stock de los patrones de referencia ácido gálico (AG) 1 mg/mL y butilhidroxianisol (BHA) 1 mg/mL. Posteriormente, se preparó una batería de concentraciones para cada patrón: AG de 0,25; 0,5; 1; 2 y 4 µg/mL y BHA de 0,5; 1; 2; 4 y 8 µg/mL. Luego, se procedió a adicionar en un tubo de ensayo 375 µL de la muestra (en el caso de los patrones de referencia cada concentración corresponde a la muestra) y 750 µL de la disolución de

DPPH (50 µM). Inmediatamente, la mezcla se homogeneizó y se incubó por 30 min a 30°C en oscuridad. Finalmente, se procedió a medir la absorbancia de la muestra a 517 nm en un espectrofotómetro UV-Visible (Shimadzu, UV-1700 PharmaSpec, Japón). Esta medición se realizó contra un blanco, en el cual se sustituyó el volumen de DPPH por metanol. También, se preparó un control con 750 µL de la disolución de DPPH (50 µM) y 375 µL de metanol. El blanco utilizado para el control fue solo metanol.

Para realizar el análisis de las muestras, se procedió a reconstituir cada extracto con metanol a una concentración de 1 mg/mL. Luego, se preparó una batería de concentraciones de 6,25; 12,5; 25; 37,5 y 50 µg/mL. Posteriormente, cada concentración fue sometida al mismo tratamiento que los compuestos de referencia. Los ensayos fueron realizados por triplicado y los resultados fueron expresados en porcentaje de decoloración del radical DPPH. Además, se calculó la CE₅₀ para cada uno de los extractos. Por otra parte, para descartar interferencias que pudieran afectar en los valores de absorbancia, se realizó un barrido de absorción de cada uno de los extractos.

Ensayo de inhibición de enzima xantina oxidasa

Los extractos secos se reconstituyeron con disolución tampón de fosfato de potasio (0,5 mM; pH 7,5), preparando una disolución stock de éstos a una concentración de 25 mg/mL. A partir de ésta, se preparó una batería de concentraciones de 2,5; 5; 10; 15; 20 y 25 mg/mL. Posteriormente, se les adicionaron 20 µL de extracto, 580 µL de solución tampón de fosfato de potasio, 100 µL de hidroxilamina (2 mM), 100 µL de EDTA (1 mM) y 100 µL de xantina (1 mM). Luego, la mezcla se homogeneizó y se pre-incubó por cinco minutos a 37°C. Además, durante este proceso se incubó, por un minuto y a la misma temperatura, la enzima XO (5,86 mU/mL). Una vez transcurridos los cinco minutos de pre-incubación, se agregaron 100 µL de enzima XO. A continuación, se dejó incubar el ensayo por 15 minutos a 37°C. Finalizado el tiempo, la reacción se detuvo con 100 µL de ácido clorhídrico (HCl; 6 N) y se procedió a medir la absorbancia a 290 nm en un espectrofotómetro UV-Visible (Shimadzu, UV-1700 PharmaSpec,

Japón). Esta medición se realizó contra un blanco, al cual se le agregó todo menos la enzima XO, siendo este volumen reemplazado por disolución tampón de fosfato de potasio. También se preparó un control en el que se agregaron los mismos reactivos menos el extracto, siendo este volumen reemplazado por la disolución tampón de fosfato de potasio. En el blanco control, se sustituyó el volumen del extracto y el de la enzima XO por la disolución tampón de fosfato de potasio. Alopurinol (200 µM) fue utilizado como compuesto de referencia. Todos los ensayos fueron realizados por triplicado.

Para determinar el tiempo de reacción que se utilizó en el ensayo, se realizó una curva de progreso de la enzima, en la que se evaluó la actividad enzimática a diferentes tiempos (0, 10, 15, 20 y 30 min) y se determinó la velocidad inicial, realizando el mismo protocolo descrito previamente, pero sin adición de la muestra.

Análisis estadístico

El análisis estadístico fue realizado mediante el paquete estadístico SPSS (*SPSS Statistics* versión 20.0). Los datos se presentan de acuerdo al promedio ± desviación estándar (DE) y se consideró un $p < 0,05$ como estadísticamente significativo. Para los datos que tuvieron una distribución normal y presentaron homogeneidad de las varianzas, se aplicó un análisis de varianza (ANOVA), mientras que para los que no presentaron una distribución normal o sus varianzas no fueron homogéneas, se aplicó una prueba no paramétrica de Kruskal-Wallis y se compararon las medias a través de la prueba de Dunn ($p < 0,05$).

RESULTADOS

Rendimiento

Los extractos polares de *L. medicinalis* obtenidos por maceración, decocción e infusión tuvieron un rendimiento que osciló entre 10,9 y 33,9 % (Tabla 1). El extracto metanólico (LM-M) y la decocción (LM-Dx) fueron los que obtuvieron mayores rendimientos ($33,9 \pm 1,2$ y $32,8 \pm 2,1$ %, respectivamente), mientras que la maceración acuosa fue la que obtuvo el menor valor (10,9 ± 1,5%).

<http://jppres.com/jppres>

Determinación cualitativa de los principales metabolitos secundarios mediante cromatografía en capa fina

En los extractos polares obtenidos en este estudio se observó una fluorescencia de color amarillo-anaranjado (Fig. 2), característica de los flavonoides (Wagner y Bladt, 1996).

Figura 2. Cromatografía en capa fina de extractos polares de *L. medicinalis* con dos sistemas de disolventes.

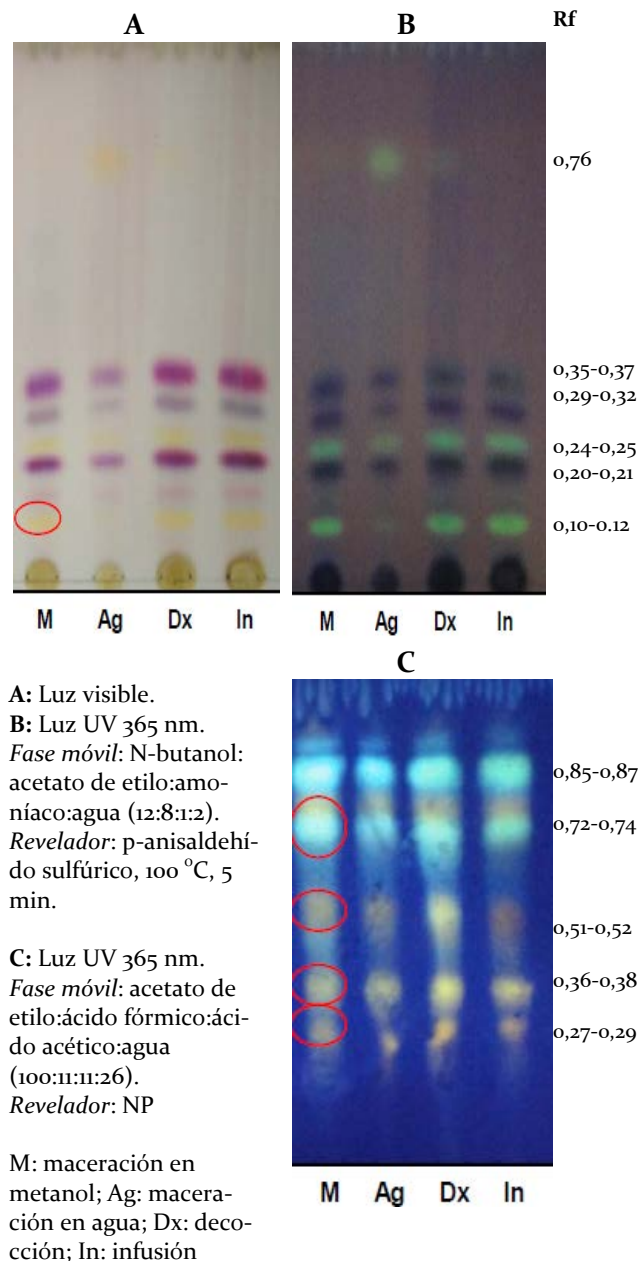


Tabla 1. Rendimiento, fenoles y flavonoides totales y actividad antioxidante de los extractos polares de *L. medicinalis*.

Extracto	Rendimiento (%)	Fenoles totales (mg EAG/100 g MS)	Flavonoides totales (mg Q/100 g MS)	DPPH (CE ₅₀ µg/mL)
LM-M	33,9 ± 1,2 ^a	5807,9 ± 340,0 ^a	115,8 ± 10,8 ^a	24,9 ± 3,6 ^a
LM-Ag	10,9 ± 1,5 ^b	1885,3 ± 62,8 ^b	50,7 ± 2,2 ^b	31,8 ± 1,7 ^b
LM-Dx	32,8 ± 2,1 ^a	4936,2 ± 355,2 ^c	136,0 ± 5,5 ^c	24,1 ± 2,7 ^a
LM-In	23,3 ± 1,8 ^c	3728,2 ± 287,5 ^d	72,8 ± 2,3 ^d	29,2 ± 2,5 ^b
Ácido gálico	-	-	-	2,7 ± 0,8 ^c
BHA	-	-	-	4,3 ± 1,2 ^c

LM-M: extracto obtenido mediante maceración en metanol; LM-Ag: extracto obtenido mediante maceración en agua; LM-Dx: extracto obtenido mediante decocción; LM-In: extracto obtenido mediante infusión. CE₅₀: concentración efectiva 50.

Distintas letras simbolizan diferencias estadísticamente significativas (p<0,05). Los datos representan el promedio ± DE de, al menos, n=3.

Determinación de fenoles y flavonoides totales

El extracto obtenido por maceración en metanol (LM-M) presentó la mayor concentración de fenoles totales (Tabla 1), mientras que el contenido de estos metabolitos en el extracto acuoso fue solamente el 32,5% del contenido de LM-M.

En la Tabla 1 también se puede observar que el extracto obtenido por decocción (LM-Dx) presentó una concentración de flavonoides totales de 136,0 ± 5,5 mg equivalentes de quercetina (EQ)/100 g muestra seca. Este resultado fue mayor que aquellos de los extractos de metanol (LM-M), infusión (LM-In) y agua (LM-Ag), con concentraciones de 115,8 ± 10,8; 72,8 ± 2,3 y 50,7 ± 2,2 mg EQ/100 g muestra seca, respectivamente. Todos los extractos presentaron diferencias estadísticamente significativas entre ellos (p<0,05).

Evaluación *in vitro* de la capacidad antioxidante

Ensayo de decoloración del radical 1,1- difenil-2-picrilhidracilo (DPPH)

Los extractos más activos fueron los obtenidos por decocción (24,1 ± 2,7 µg/mL) y por maceración en metanol (CE₅₀ = 24,9 ± 3,6 µg/mL), los cuales no presentaron diferencias significativas entre ellos (p>0,05). Estos resultados fueron seguidos por infusión (CE₅₀ = 29,2 ± 2,5 µg/mL) y

maceración en agua (CE₅₀ = 31,8 ± 1,7 µg/mL), los que tampoco presentaron diferencias significativas entre ellos (p>0,05). Se utilizaron como compuestos de referencias ácido gálico y BHA (CE₅₀= 2,7 ± 0,8 y 4,3 ± 1,2 µg/mL, respectivamente).

Ensayo de inhibición de enzima xantina oxidasa

Los extractos polares de *L. medicinalis*, obtenidos en este estudio, no presentaron inhibición sobre la enzima XO (datos no mostrados) a las concentraciones ensayadas. Se utilizó el alopurinol como fármaco de referencia, el que presentó una inhibición de 61,3%.

DISCUSIÓN

La actividad antioxidante ha sido reportada en diversas especies de la familia Verbenaceae, realizándose estudios sobre especies del género *Aloysia* (Ej. *A. triphylla*), *Lantana* (Ej. *L. camara* o *armata*), *Lippia* (Ej. *L. alba* o *geniculata*, *L. multiflora*, entre otras) y *Verbena* (Ej. *V. officinalis*, *V. litoralis*), principalmente (Stashenko et al., 2008; Shikanga et al., 2010; Arthur et al., 2011; Rehecho et al., 2011). Sin embargo, a pesar del interés demostrado por el estudio de esta familia, no se han encontrado investigaciones sobre la especie *Lampaya medicinalis*.

Los sistemas de disolventes seleccionados en este estudio, para determinar la composición

química cualitativa de los extractos, son adecuados para determinar diversos tipos de compuestos, en especial terpenos, saponinas y flavonoides. Es por esto que los extractos estudiados de *L. medicinalis* podrían presentar diversos tipos de estos compuestos, ya que según Wagner y Bladt (1996), las bandas de color azul y rosa-violeta, reveladas con el reactivo p-anisal-dehído sulfúrico (Fig. 2A), demuestran la presencia de saponinas triterpénicas y terpenos, mientras que las bandas de color amarillo-café podrían corresponder a saponinas esteroidales. Por otra parte, según los mismos autores, las bandas de color azul o celeste fluorescente, reveladas con el reactivo de productos naturales (NP), es típica de extractos que presentan ácidos fenil-carboxílicos (Ej. ácido cafeico o ácido clorogénico) o cumarinas (Ej. escopoletina), mientras que las bandas de color amarillo-anaranjado corresponden a flavonoides. Asimismo, un estudio realizado por Berardi (2012), determinó la presencia de ácidos fenil-carboxílicos en especies del género *Aloysia*, en el que se destaca la intensa fluorescencia celeste de estos en una CCF.

La diferencia significativa entre todos los extractos, en la determinación de fenoles y flavonoides totales, se podría deber a la capacidad de los disolventes para extraer los compuestos desde el material vegetal, a la temperatura o al tiempo de extracción (Sreejith et al., 2012). Lo cual podría explicar también el alto porcentaje de rendimiento de estos extractos (Tabla 1), demostrando que el disolvente utilizado en el proceso de extracción juega un rol importante en la actividad de los extractos, considerando la polaridad tanto del disolvente como la de los compuestos fenólicos (Ricco et al., 2010). Por consiguiente, al utilizar un disolvente de alta polaridad puede ocurrir que se rompa la membrana celular y mejore la extracción, lo que explicaría el alto porcentaje de rendimiento y las concentraciones obtenidas por el extracto metanólico.

Además, el metanol podría reducir la actividad de las polifenoloxidasas, enzimas propias de los tejidos vegetales, que catalizan la oxidación enzimática de los compuestos fenólicos endógenos (proceso de pardeamiento de los vegetales)

(Jang et al., 2002). Sin embargo, los extractos acuosos obtenidos por decocción e infusión, también presentaron mayores concentraciones de polifenoles (Tabla 1), lo cual podría explicarse por la aplicación de temperatura en su tratamiento de extracción, ya que las enzimas pueden ser inactivadas con el calor, de modo que los compuestos fenólicos no son degradados (Kähkönen et al., 2001). En consecuencia, se obtiene una mayor concentración de polifenoles, como se observó en el caso del extracto obtenido por decocción, que a pesar de que su tratamiento de extracción pueda ser drástico para fenoles lábiles, arrojó una mayor concentración que los otros extractos acuosos.

Por otra parte, las altas concentraciones de fenoles y flavonoides, pueden deberse a que el crecimiento de *L. medicinalis* ocurre en áreas altamente expuestas a la radiación UV, lo que puede inducir o incrementar la biosíntesis de flavonoides (Martínez et al., 2003). Además, el aumento de los compuestos fenólicos como resultado de la tensión térmica se ha asociado con el aumento en la actividad de fenilalanina amonio liasa, una enzima clave en el metabolismo de compuestos fenólicos tales como: ácidos fenólicos, feniletanoides o flavonoides, los cuales son considerados los principales constituyentes de la actividad antioxidante en vegetales (López-Laredo et al., 2012).

Existen diversos métodos para evaluar la actividad antioxidante de un extracto, ya sea *in vitro* o *in vivo*, siendo los métodos *in vitro* los más aplicados para determinar la capacidad antioxidante frente a sustancias cromógenas de naturaleza radical, debido a su rapidez y facilidad. No obstante, las determinaciones realizadas *in vitro* solo proporcionan una idea aproximada de lo que ocurre en situaciones complejas *in vivo* (Kuskoski et al., 2005).

En el presente estudio, al evaluar los extractos en el ensayo de decoloración del radical DPPH, se observó que el extracto metanólico y la decocción arrojaron la mayor actividad antioxidante, con una baja CE_{50} respecto a los demás extractos (Tabla 1), sin diferencias estadísticamente significativas entre ellos ($p > 0,05$).

Asimismo, estos resultados coinciden con las altas concentraciones de polifenoles obtenidos

por los mismos extractos, lo que sugiere que los flavonoides juegan un rol importante en la captación del radical DPPH, demostrándose así la actividad antioxidante. Debido a esto, diferentes estudios relacionan la capacidad antioxidante con el contenido de fenoles totales y cada compuesto fenólico contribuye de forma y proporción diferente (Kuskoski et al., 2005). Además, los compuestos fenólicos poseen una estructura química adecuada para ejercer una acción antioxidante, actuando como captadores de radicales libres (Ricco et al., 2010).

Por otra parte, la inhibición sobre determinadas oxidasas representa otro de los mecanismos a través de los cuales los flavonoides ejercen su actividad antioxidante, siendo la inhibición de la enzima XO un método adecuado para conocer esta actividad *in vitro* (Pérez, 2003). Según lo descrito en la literatura existe una relación estructura-actividad de los flavonoides, la inhibición de la XO y la captura del radical superóxido, en la que la existencia de grupos hidroxilos en los carbonos 5 y 7 del anillo A y el doble enlace entre los carbonos 2 y 3 del anillo C, aumenta la actividad inhibitoria de la XO, siendo esto mayor en flavonas que flavonoles y la presencia de grupos hidroxilos en 3' del anillo B y 3 del anillo C se asocian con un aumento en la actividad captadora del radical superóxido (Cos et al., 1998). Además, un estudio realizado sobre *Lantana camara* (Verbenaceae) reportó actividad inhibitoria sobre XO (Mahdi-Pour et al., 2012). Sin embargo, al medir la actividad inhibitoria de los extractos de *L. medicinalis* sobre XO, se observó que ningún extracto produjo inhibición a las concentraciones ensayadas. Esto se podría deber a que los extractos afecten otras especies reactivas del oxígeno que no sea el radical superóxido.

Por último, los resultados obtenidos en el presente estudio demostraron que los extractos de las hojas de *L. medicinalis* podrían ser una fuente potencial de compuestos con actividad antioxidante, lo que sugiere centrar estudios posteriores en demostrar y validar su uso etnomédico, y a conocer los metabolitos específicos que participan en cada actividad, además de

determinar la toxicidad que pueda presentar esta planta sobre el organismo humano.

CONCLUSIONES

Se obtuvieron extractos de la especie *Lampaya medicinalis* F. Phil. con los que se pudo determinar el contenido de fenoles y flavonoides totales, así como la actividad antioxidante. Mediante la cromatografía en capa fina, se determinó cualitativamente la posible presencia de diversos compuestos en *L. medicinalis*, como saponinas triterpénicas, saponinas esteroidales, terpenos y compuestos fenólicos. La mayor concentración de fenoles totales se obtuvo con el extracto por maceración en metanol ($5807,94 \pm 340,04$ mg EAG/100 g muestra seca) mientras que la decocción presentó la mayor concentración de flavonoides totales ($136,01 \pm 5,53$ mg EQ/100 g muestra seca). Sin embargo, se consideró que la determinación de flavonoides realizada en este estudio sólo determina flavonas y flavonoles. Además, ambos extractos presentaron el mayor porcentaje de rendimiento (33,9 y 32,8%, respectivamente), lo que indicaría la relación que existe entre el modo de extracción o disolvente utilizado para ésta, con la concentración de compuestos fenólicos.

Por otra parte, los extractos obtenidos por maceración en metanol y decocción presentaron la mayor actividad antioxidante (CE_{50} de $24,94 \pm 3,63$ y $24,13 \pm 2,70$ $\mu\text{g/mL}$, respectivamente) mediante el ensayo de decoloración del radical DPPH. Sin embargo, ninguno de ellos mostró actividad inhibitoria sobre la enzima XO a las concentraciones utilizadas.

En este trabajo se demuestra, por primera vez, la presencia de fenoles y flavonoides totales, así como la actividad antioxidante de extractos obtenidos a partir de *Lampaya medicinalis*, que podría justificar el uso etnomédico de esta planta.

CONFLICTO DE INTERÉS

Los autores declaran no poseer conflicto de interés.

AGRADECIMIENTOS

Este trabajo fue financiado por el Proyecto UCN3315-2010 y la Facultad de Ciencias, Universidad

Católica del Norte. Los autores agradecen a la Srta. Mónica Arenas por la colecta del material vegetal.

REFERENCIAS

- Arthur H, Joubert E, De Beer D, Malherbe CJ, Witthuhn RC (2011) Phenylethanoid glycosides as major antioxidants in *Lippia multiflora* herbal infusion and their stability during steam pasteurisation of plant material. *Food Chem* 127: 581-588.
- Bassman JH (2004) Ecosystem consequences of enhanced solar ultraviolet radiation: secondary plant metabolites as mediators of multiple trophic interactions in terrestrial plant communities. *Photochem Photobiol* 79(5): 382-398.
- Berardi A (2012) Etnofarmacología gastrointestinal de plantas medicinales argentinas del género *Aloysia*, familia Verbenaceae: mecanismo de acción y relación con los principios activos. Trabajo de tesis de magister en plantas medicinales. 1a edición. La Plata: Universidad Nacional de La Plata. pp.78
- Carrasco-Ríos L (2009) Efecto de la radiación ultravioleta-B en plantas. *IDESIA (Chile)* 27: 59-76.
- Chang CC, Yang MH, Wen HM, Chern JC (2002) Estimation of total flavonoid content of propolis by two complementary colorimetric methods. *J Food Drug Anal* 10(3): 178-182.
- Cos P, Ying L, Calomme M, Hu JP, Cimanga K, Van Poel B, Pieters L, Vlietinck AJ, Vanden Berghe D (1998) Structure-activity relationship and classification of flavonoids as inhibitors of xanthine oxidase and superoxide scavengers. *J Nat Prod* 61: 71-76.
- Dörner C, Galleguillos M, Adarmes H (2006) ¿Qué son los flavonoides y a qué se debe su efecto protector? *Revista TecnoVet* 12(2): 14-18.
- Green R, Fluhr R (1995) UV-B-induced PR-1 accumulation is mediated by active oxygen species. *Plant Cell* 7(2): 203-212.
- Jang MS, Sanada A, Ushio H, Tanaka M, Ohshima T (2002) Inhibitory effects of "Enokitake" mushroom extracts on polyphenol oxidase and prevention of apple browning. *LWT - Food Sci Technol* 35(8): 697-702.
- Kähkönen MP, Hopia AI, Heinonen M (2001) Berry phenolics and their antioxidant activity. *J Agric Food Chem* 49(8): 4076-4082.
- Kuskoski ME, Asuero AG, Troncoso AM, Mancini-Filho J, Fett R (2005) Aplicación de diversos métodos químicos para determinar actividad antioxidante en pulpa de frutos. *Cienc Tecnol Aliment, Campinas* 25(4): 726-732.
- López-Laredo AR, Gómez-Aguirre YA, Medina-Pérez V, Salcedo-Morales G, Sepúlveda-Jiménez G, Trejo-Tapia G (2012) Variation in antioxidant properties and phenolics concentration in different organs of wild growing and greenhouse cultivated *Castilleja tenuiflora* Benth. *Acta Physiol Plant* 34(6): 2435-2442.
- Mackerness SAH, John CF, Jordan B, Thomas B (2001) Early signaling in ultraviolet-B reposes: distinct roles for different reactive oxygen species and nitric oxide. *FEBS Lett* 489: 237-242.
- Mahdi-Pour B, Jothy SL, Latha LY, Chen Y, Sasidharan S (2012) Antioxidant activity of methanol extracts of different parts of *Lantana camara*. *Asian Pac J Trop Biomed* 2(12): 960-965.
- Martínez A (2005) Flavonoides. Medellín, Universidad de Antioquia, Facultad de Química Farmacéutica. p. 76.
- Ministerio de Salud, Gobierno de Chile (2009) Medicamentos herbarios tradicionales. Santiago, Chile.
- Pérez G (2003) Los flavonoides: antioxidantes o pro-oxidantes. *Rev Cubana Invest Biomed* 22(1): 48-57.
- Rehecho S, Hidalgo O, García-Iñiguez de Cirano M, Navarro I, Astiasarán I, Ansorena D, Cavero RY, Calvo MI (2011) Chemical composition, mineral content and antioxidant activity of *Verbena officinalis* L. *LWT - Food Sci Technol* 44: 875-882.
- Ricco RA, Wagner ML, Portmann E, Reides C, Llesuy S, Gurni AA, Carballo MA (2010) Análisis de polifenoles, actividad antioxidante y genotoxicidad en especies argentinas de *Lippia* y *Aloysia* (Verbenaceae). *Bol Latinoamer Caribe Plant Med Aromat* 9(5): 388-396.
- Shikanga EA, Combrinck S, Regnier T (2010) South African *Lippia* herbal infusions: total phenolic content, antioxidant and antibacterial activities. *S Afr J Bot* 76: 567-571.
- Sreejith M, Kannappan N, Santhiagu A, Marathakam A, Ajith PM, Jaseem S (2012) *In vitro* xanthine oxidase inhibitory and antioxidant activities of aerial parts of *Flacourtia sepiaria* Roxb. *Oriental Pharm Exp Med* 13(2): 113-120.
- Stashenko E, Ruiz C, Muñoz A, Castañeda M, Martínez JR (2008) Composition and antioxidant activity of essential oils of *Lippia organoides* H.B.K. grown in Colombia. *Natural Product Communications* 3(4): 563-566.
- Villagrán C, Romo M, Castro V (2003) Etnobotánica del sur de Los Andes de la primera región de Chile: un enlace entre las culturas altiplánicas y las de quebradas altas del Loa superior. *Chungara, Rev Antropol Chilena* 35(1): 73-124.
- Wagner H, Bladt S (1996) *Plant Drug Analysis. A Thin Layer Chromatography Atlas*. Springer Verlag, Berlin. p. 384.
- Waterhouse AL (2002) Determination of total phenolics. En: Wrolstad RE, Acree TE, Decker EA, Penner MH, Reid DS, Schwartz SJ, Shoemaker CF, Smith DM, and Sporns P (Eds.). *Current protocols in Food Analytical Chemistry*. John Wiley and Sons, Inc. pp. 1.1.1-1.1.8.
-