



**UNIVERSIDAD
DE ANTIOQUIA**

1803

**UNIVERSIDAD DE ANTIOQUIA
FACULTAD DE CIENCIAS FARMACÉUTICAS Y ALIMENTARIAS**

**ESTUDIO FARMACOCINÉTICO DE UN EXTRACTO ESTANDARIZADO DE
BIFLAVONOIDES DE *Garcinia madruno*: UNA APROXIMACIÓN AL DESARROLLO
DE UN INGREDIENTE FUNCIONAL ANTIOXIDANTE**

**Trabajo de grado presentado por Luis Carlos Carrillo Hormaza para optar al título de
Magister en Ciencias Farmacéuticas y Alimentarias de la Universidad de Antioquia**

Tutor

Edison Javier Osorio Durango, MSc, PhD.

Comité Tutorial

Gloria Patricia Cardona Gómez, PhD.

Julián Londoño Londoño, PhD

MAESTRÍA EN CIENCIAS FARMACÉUTICAS Y ALIMENTARIAS

ÁREA: BIORGÁNICA Y PRODUCTOS NATURALES

MEDELLIN-COLOMBIA

2015

AGRADECIMIENTOS

Quisiera expresar mis agradecimientos a todas y cada una de las personas y entidades que me colaboraron en la ejecución de esta tesis:

Al profesor Edison Osorio por permitirme ingresar al GISB y principalmente por la confianza que ha depositada en mí en el transcurso de estos años, permitiéndome crecer a nivel laboral, investigativo y personal

A los miembros de mi comité tutorial el Dr Julián Londoño y la Dra Patricia Cardona por sus innumerables aportes en la construcción y ejecución de este trabajo.

A la Universidad de Antioquia específicamente al proyecto CPT 1219 del CODI por la financiación del trabajo experimental

Al programa de “Joven Investigador Colciencias” 2012-2013 por cubrir mis gastos de manutención.

A los investigadores y amigos Oscar Lara y Andrés Gil por la formación y consejos recibidos a lo largo de mi proceso de formación y en especial por el aliento y confianza depositada durante mi formación de pregrado. Sin duda alguna lo ha aprendido en esta etapa fue el pilar y la base de los resultados alcanzados en este trabajo.

Al grupo de Investigación de Neurociencias de Antioquia, en especial a la Dra Patricia Cardona y a la MSc Angélica Sabogal por la inmensa colaboración prestada en la realización de los estudios de biodisponibilidad.

A la Fundación INTAL y en especial a Andrés Gallo por la colaboración prestada en el desarrollo de los métodos por LC MS/MS

Al programa de maestría en ciencias farmacéuticas y alimentarias por contribuir en mi formación y en especial a los profesores Carlos López y Omar Correa por las excelentes clases brindadas, las cuales fueron el fundamento teórico práctico de lo realizado en este trabajo.

A todo los integrantes del Grupo de Investigación en Sustancias Bioactivas por sus valiosos consejos, compañía y por ser mucho más que compañeros de trabajo.

A mi grupo de trabajo conformado por Ana Ramírez, Camilo Quintero, Marlon Cossío y Kathy Montilla, porque sin ellos y sin el trabajo articulado que planteamos, ninguno de los logros y metas alcanzadas habría sido posible, muchas gracias por el esfuerzo y dedicación que han mostrado y espero que podamos seguir trabajando juntos en procura de alcanzar todas nuestras metas.

Finalmente, mi mayor agradecimiento es para las personas que más amo: mis padres (Angélica y Luis Jesús), mis hermanas (Adriana y Mayra) y mi novia (Natalia), ustedes han sido y serán siendo mi apoyo incondicional, por tanto comparto con ustedes este y cada uno de los logros que alcance.

RESUMEN

Garcinia madruno (Kunt) Hammel, comúnmente conocido como “Madroño”, es una especie endémica de centro y sur América perteneciente a la familia Clusiaceae. Dentro de los fitoquímicos mayoritarios de la especie se encuentran una serie de biflavonoides, los cuales mediante estudios previos, han mostrado un alto potencial antioxidante, y una actividad hipolipemiante, ateroprotectora y neuroprotectora significativa, evaluadas mediante estudios *in vitro* e *in vivo*. Con este estudio se pretende la generación de extractos estandarizados precursores de ingredientes funcionales obtenidos a partir de las partes aéreas de *G. madruno*, con alto contenido de biflavonoides, con una actividad antioxidante significativa y con el conocimiento de la biodisponibilidad y de los parámetros farmacocinéticos de sus principales constituyentes. Entre los resultados obtenidos, empleando un método desarrollado y validado por HPLC-DAD-MS se lograron cuantificar 4 biflavonoides e identificar 4 más en 5 matrices diferentes de *G. madruno*. Conforme a las matrices evaluadas, las hojas se constituyen como una fuente promisoría de los 8 biflavonoides y el epicarpio como una fuente importante de fukugisido y morelloflavona, este último alcanzando un contenido mayor al 10 % de biflavonoides totales cuantificados con respecto al material seco. La optimización del proceso de extracción, conjuntamente con la purificación de los extractos empleando diseños experimentales, permitió alcanzar un contenido de biflavonoides totales en los extractos secos correspondiente a: 47.2, 32.7, 29.5, 23.1 y 2.5 % para el epicarpio, hojas, tallos, semillas y mesocarpio respectivamente, siendo fukugisido y morelloflavona los componentes mayoritarios en todos los casos. Así mismo, fukugisido y morelloflavona fueron los compuestos responsables de la actividad antioxidante a través de un mecanismo mayoritariamente SPLET. Con respecto a la biodisponibilidad y a los parámetros farmacocinéticos de los biflavonoides, volkensiflavona fue el compuesto que presentó mayor área bajo la curva normalizada por la dosis. En todos los casos los biflavonoides vieron aumentada su biodisponibilidad cuando fueron administrados a través de un extracto estandarizado en comparación con la administración de los compuestos puros y en relación con los flavonoides estructuralmente relacionados, la biodisponibilidad de los biflavonoides se vio notablemente disminuida. Así, los resultados obtenidos proponen a *G. madruno* como una especie referente del género en la expresión de biflavonoides tipo morelloflavona. En adición los extractos de hojas y epicarpio se constituyen como posibles ingredientes bioactivos con hasta un 50% de biflavonoides, representado el punto de partida para el desarrollo de productos de valor conforme a las propiedades benéficas de los biflavonoides en la prevención y tratamiento de algunas enfermedades crónicas no transmisibles.

Palabras claves: *Garcinia madruno*; Biflavonoides; Enfermedades crónicas no transmisibles; Ingredientes funcionales y Biodisponibilidad.

ABSTRACT

Garcinia madruno (Kunt) Hammel, known as “Madroño” is an endemic plant species of Central and South America belongs to the Clusiaceae family. The main phytochemicals are the biflavonoids, compounds recognized in previously works by its high *in vitro* and *in vivo* radical scavenger, hypocholesterolemic, neuroprotective and atheroprotective activities. The aim of the current work were the development of standardized extracts precursors of functional ingredients obtained of aerial parts of *G. madruno* with high content of biflavonoids, high antioxidant activity and contribute to the knowledge of the bioavailability and pharmacokinetics of the main constituents. Among the results, using a validated HPLC-DAD-MS method, 8 different biflavonoids were identified and 4 were quantified at five different matrices of *G. madruno*. The results indicate that the leaves are a promising source of the 8 biflavonoids and the epicarp is a rich source mainly of morelloflavone and fukugiside. Using experimental designs, the optimization of the extraction process together with the clean-up of the extracts allowed to obtain 47.2, 32.7, 29.5, 23.1 and 2.5 % of total biflavonoids in the dry extracts of epicarp, leaves, stems, seeds and mesocarp respectively. Morelloflavone and fukugiside were the majority compounds in all extracts obtained. In addition, they were also the compounds responsible for antioxidant activity mainly using a SPLET mechanism. Regarding to the bioavailability and pharmacokinetic of biflavonoids, volkensiflavone was the compound with the major value of the area under the curve normalized by the dose. Additionally, the bioavailability of the *G. madruno* biflavonoids increased in all cases when these were administered through a standardized extract compared to the administration of the pure compounds and was significantly lower in comparison to the flavonoids monomers. Thus, the results suggest that *G. madruno* could be a reference species of the genus *Garcinia* in the expression of morelloflavone type biflavonoids, in addition the leaves and epicarp extracts are established as potential bioactive ingredients with up to 50% of biflavonoids, representing of this way the starting point for the development of functional products in accordance with the beneficial properties of biflavonoids in the prevention and treatment of some chronic noncommunicable diseases.

Key words: *Garcinia madruno*, Biflavonoids; Chronic noncommunicable diseases; Functional ingredients and Bioavailability.

TABLA DE CONTENIDO

| | | |
|------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------------|
| 1 | <u>INTRODUCCIÓN</u> | <u>12</u> |
| 2 | <u>MARCO TEÓRICO</u> | <u>17</u> |
| 2.1 | Radicales libres y especies reactivas: importancia a nivel patológico y fisiológico | 17 |
| 2.1.1 | Características de los radicales libres y especies reactivas | 17 |
| 2.1.2 | Generación, conversión y eliminación de ERs en sistemas fisiológicos. | 19 |
| 2.1.3 | Estrés oxidativo: clasificación e implicación de las ERs en procesos fisiológicos y patológicos | 23 |
| 2.2 | Compuestos fenólicos y su rol en la salud humana | 26 |
| 2.3 | <i>Garcinia madruno</i> y sus biflavonoides | 29 |
| 2.3.1 | Distribución y aspectos botánicos de <i>Garcinia madruno</i> | 29 |
| 2.3.2 | Aspectos fitoquímicos y terapéuticos del género <i>Garcinia</i> y de la especie <i>Garcinia madruno</i> . | 30 |
| 2.4 | Ingredientes de valor derivados de productos naturales de origen vegetal | 35 |
| 2.4.1 | Tecnologías de extracción limpia para la obtención de ingredientes de valor | 37 |
| 2.5 | Estudios farmacocinéticos y de biodisponibilidad: importancia en el estudio de eficacia de productos naturales. | 38 |
| 3 | <u>OBJETIVOS</u> | <u>44</u> |
| 3.1 | Objetivo general | 44 |
| 3.2 | Objetivos específicos | 44 |
| 4 | <u>EVALUACIÓN CUALITATIVA Y CUANTITATIVA DE BIFLAVONOIDES DE <i>GARCINIA MADRUNO</i></u> | <u>45</u> |
| 4.1 | Materiales y métodos | 45 |
| 4.1.1 | Material vegetal | 45 |
| 4.1.2 | Material de referencia empleado | 45 |
| 4.1.3 | Preparación de muestras | 46 |
| 4.1.3.1 | Extractos no hidrolizados | 46 |
| 4.1.3.2 | Extractos hidrolizados | 46 |
| 4.1.4 | Análisis de biflavonoides de <i>G. madruno</i> por HPLC-DAD-MS | 47 |

| | | |
|------------|---------------------------------------------------------------|-----------|
| 4.1.4.1 | Cuantificación de biflavonoides de <i>G. madruno</i> | 47 |
| 4.1.4.2 | Validación del método analítico | 48 |
| 4.2 | Resultados y discusión. | 50 |
| 4.2.1 | Desarrollo y optimización de la metodología cromatográfica | 50 |
| 4.2.2 | Identificación de biflavonoides de <i>G. madruno</i> | 53 |
| 4.2.3 | Evaluación cuantitativa de biflavonoides de <i>G. madruno</i> | 60 |
| 4.2.3.1 | Validación del método | 60 |
| 4.2.3.2 | Biflavonoides de <i>G. madruno</i> | 62 |

5 DESARROLLO DE EXTRACTOS OPTIMIZADOS CON ALTOS CONTENIDOS DE BIFLAVONOIDES A PARTIR DE *GARCINIA MADRUNO* **66**

| | | |
|------------|----------------------------------------------------------------------------------------|-----------|
| 5.1 | Materiales y métodos | 66 |
| 5.1.1 | Optimización de la extracción | 66 |
| 5.1.1.1 | Determinación de los factores más influyentes en la extracción de biflavonoides. | 66 |
| 5.1.1.2 | Optimización de la extracción mediante la metodología de superficie de respuesta. | 67 |
| 5.1.2 | Eliminación de interferencias | 68 |
| 5.1.2.1 | Compuestos apolares y clorofilas | 68 |
| 5.1.2.2 | Compuestos polares | 69 |
| 5.2 | Resultados y discusión | 70 |
| 5.2.1 | Determinación de los factores más influyentes en la extracción de biflavonoides. | 70 |
| 5.2.2 | Optimización de la extracción mediante la metodología de superficie de respuesta (RSM) | 73 |
| 5.2.3 | Purificación de los extractos | 78 |
| 5.2.4 | Extractos obtenidos | 83 |

6 ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE DE BIFLAVONOIDES DE *GARCINIA MADRUNO* **86**

| | | |
|------------|----------------------------------------------------------------------------------------------|-----------|
| 6.1 | Materiales y Métodos | 86 |
| 6.1.1 | Método ORAC (Oxygen Radical AbsorbanceCapacity) | 86 |
| 6.1.2 | Método FRAP (Ferric Reducing Antioxidant Power) | 86 |
| 6.1.3 | Evaluación del contenido de polifenoles totales (TPC) mediante el método de Folin-Ciocalteu. | 87 |
| 6.1.4 | Estudio Relación Estructura Actividad-Antioxidante (REA) | 87 |
| 6.1.5 | Análisis estadísticos | 88 |
| 6.2 | Resultados y discusión | 88 |
| 6.2.1 | Actividad antioxidante de muestras y extractos | 88 |
| 6.2.2 | Mecanismo antioxidante y relación estructura actividad | 91 |

| | | |
|------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------|
| 7 | <u>ESTUDIO FARMACOCINÉTICO DE BIFLAVONOIDES DE GARCINIA MADRUNO</u> | 99 |
| 7.1 | Materiales y métodos. | 99 |
| 7.1.1 | Estudio farmacocinético | 99 |
| 7.1.2 | Instrumentación y condiciones analíticas | 100 |
| 7.1.3 | Soluciones estándares, curva de calibración y muestras de control de calidad (QC) | 100 |
| 7.1.4 | Preparación de las muestras | 101 |
| 7.1.5 | Validación del método | 101 |
| 7.2 | Resultados y discusión | 103 |
| 7.2.1 | Desarrollo y optimización de la metodología analítica | 103 |
| 7.2.2 | Validación del método | 108 |
| 7.2.3 | Estudio farmacocinético de biflavonoides de <i>G. madruno</i> y sus flavonoides estructuralmente relacionados | 111 |
| 8 | <u>CONCLUSIONES</u> | 117 |
| 9 | <u>PERSPECTIVAS</u> | 119 |
| 10 | <u>REFERENCIAS</u> | 120 |

LISTA DE FIGURAS

| | |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Figura 1. Principales especies reactivas radicalarias y no radicalarias de interés fisiológico. | 18 |
| Figura 2. Formación y conversión de EROs y ERNs a partir de los radicales libres primarios: $O_2^{\bullet-}$ y $\bullet NO$ | 21 |
| Figura 3. Regulación homeostática en la producción, conversión y eliminación de ERs.] | 23 |
| Figura 4. Contenido dinámico de ERs en el tiempo, clasificación del estrés oxidativo (A) e implicaciones en procesos fisiológicos y patológicos (B). | 25 |
| Figura 5. Rol fisiológico de los polifenoles en la prevención primaria y secundaria de las ENT. | 28 |
| Figura 6. Distribución de <i>G. madruno</i> en América. | 30 |
| Figura 7. Descripción gráfica de la especie <i>Garcinia madruno</i> (Kunth) Hammel. | 31 |
| Figura 8. Principales metabolitos secundarios aislados de especies del genero <i>Garcinia</i> | 32 |
| Figura 9. Esquema general de absorción, metabolismo y excreción de xenobioticos, fármacos y compuestos fenólicos. | 40 |
| Figura 10. Mecanismo de absorción y metabolismo presistémico de flavonoides y compuestos fenólicos. | 42 |
| Figura 11. Separación cromatográfica de los biflavonoides de <i>G. madruno</i> | 52 |
| Figura 12. Perfil cromatográfico de muestras hidrolizadas y no hidrolizadas. | 54 |
| Figura 13. Evaluación cuantitativa de las muestras hidrolizadas y no hidrolizadas de las diferentes matrices de <i>G. madruno</i> | 56 |
| Figura 14. Análisis por LC-MS de los biflavonoides presentes en un extracto de hojas de <i>G. madruno</i> | 58 |
| Figura 15. Esquema de fragmentación propuesto para las picos 5 y 7. | 59 |

| | |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|
| Figura 16. Contenido de biflavonoides en las diferentes matrices de <i>G. madruno</i> | 63 |
| Figura 17. Efecto del tiempo, solvente orgánico proporción de agua y pH en la extracción de los biflavonoides. | 72 |
| Figura 18. Gráficos de superficie de respuesta y contornos. | 77 |
| Figura 19. Efecto del Clean up de compuestos apolares sobre la concentración de biflavonoides en los extractos. | 80 |
| Figura 20. Gráficos de superficies de respuesta y de Pareto para cada una de las respuestas evaluadas en el BBD del clean up de compuestos polares. | 82 |
| Figura 21. Esquema del procesos empleado en la obtención de extractos con alto contenido de biflavonoides a partir de <i>G. madruno</i> | 83 |
| Figura 22. Actividad antioxidante de <i>G. madruno</i> y estudios de correlación frente al contenido de biflavonoides. | 89 |
| Figura 23. Mecanismos antioxidantes de compuestos fenólicos. | 92 |
| Figura 24. Relación estructura actividad de biflavonoides y flavonoides estructuralmente relacionados evaluados mediante el mecanismo SET. | 94 |
| Figura 25. Relación estructura actividad de biflavonoides y flavonoides estructuralmente relacionados evaluados mediante el mecanismo SPLET/HAT. | 96 |
| Figura 26. Espectro de masas correspondiente al escaneo completo de productos de los iones precursores [M-H] de los biflavonoides. | 105 |
| Figura 27. Cromatogramas representativos en modo SRM de los respectivos analitos y el IS obtenidos en plasma blanco hidrolizado (primera columna), en plasma blanco dopado al nivel del LLOQ (segunda columna) y muestras representativas del estudio farmacocinético (tercera columna). | 107 |
| Figura 28. Perfiles de concentración plasmática versus tiempo de biflavonoides y flavonoides totales obtenidos en plasma de rata tras la administración única por vía oral de un mix de flavonoides, biflavonoides y un extracto estandarizado de hojas de <i>G. madruno</i> | 113 |

LISTA DE TABLAS

| | |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|
| Tabla 1. Linealidad, rango dinámico y límites de cuantificación obtenidos..... | 61 |
| Tabla 2. Precisión y exactitud del método | 62 |
| Tabla 3. Diseño experimental para la evaluación de los factores más influyentes en la extracción | 67 |
| Tabla 4. Variables y niveles utilizados en el BBD | 68 |
| Tabla 5. Variables y niveles utilizados en el BBD del “clean up” de compuestos polares | 70 |
| Tabla 6. Variables involucradas en el BBD con sus respectivas respuestas obtenidas para cada biflavonoide..... | 74 |
| Tabla 7. Análisis de varianza de los resultados experimentales obtenidos con el BBD para cada uno de los biflavonoides..... | 75 |
| Tabla 8. Variables involucradas en el BBD del clean up de compuestos polares con sus respectivas respuestas obtenidas..... | 81 |
| Tabla 9. Contenido de biflavonoides en matrices y extractos de <i>G. madruno</i> | 84 |
| Tabla 10. Transiciones de <i>m/z</i> obtenidas para cada analito e IS en el modo SRM con su respectiva energía de colisión (EC). | 104 |
| Tabla 11. Ecuaciones de regresión, tiempo de retención, rangos y LLOQ para los biflavonoides y flavonoides evaluados. | 108 |
| Tabla 12. Precisión, exactitud, porcentaje de recuperación y efecto matriz de cada uno de los analitos evaluados..... | 109 |
| Tabla 13. Estabilidad de los flavonoides y biflavonoides en plasma de rata bajo diferentes condiciones..... | 110 |
| Tabla 14. Parámetros farmacocinéticos de biflavonoides y flavonoides totales tras la administración oral de un mix de flavonoides, biflavonoides y un extracto estandarizado de hojas de <i>G. madruno</i> | 114 |

1 INTRODUCCIÓN

Las enfermedades no transmisibles (ENT) actualmente son la principal causa de muerte en el mundo. De acuerdo al último reporte de la Organización Mundial de la Salud (OMS), las ENT fueron las responsables del 63% de las muertes mundiales (36 millones), previéndose un incremento para el 2020 de un 15 % en países desarrollados y de hasta un 20% en países en vía de desarrollo [1,2]. Para el 2008 en Colombia, según la OMS en su reporte por países, el 66% de las muertes fueron causadas por alguna ENT [3]. Estas cifras superan a las generadas por muertes violentas (21%) y por enfermedades de tipo transmisible (13%) [4]. Entre las principales ENT se destacan aquellas relacionadas con desórdenes metabólicos (diabetes y síndrome metabólico); enfermedades cerebro cardiovasculares (ECV) (principalmente la aterosclerosis y las manifestaciones clínicas derivadas de esta); enfermedades neurodegenerativas (END) (enfermedad de Alzheimer (EA), demencia y enfermedad de Parkinson (EP)); enfermedades respiratorias crónicas (ERC) (asma y EPOC); y otras enfermedades como el cáncer, la osteoporosis, entre otras [1,5].

Entre las ENT, alrededor del 80 % de las muertes están atribuidas principalmente a las ECV, al cáncer y a las ERC [6]. Además, si bien las END no representan un tasa de mortalidad comparable a las anteriores enfermedades, se prevé, según cálculos de la asociación Alzheimer's Disease International, que en el 2030 y el 2050 podrían existir hasta 65,7 y 115,4 millones de personas con la EA, respectivamente [7]. Es por tanto, que los costos de atención médica y la forma en que afectan la fuerza productiva, hacen de todas estas enfermedades una de las mayores amenazas del desarrollo económico y uno de los mayores retos para la salud pública mundial. A tal punto que en el 2005 los gastos en salud provenientes del tratamiento, únicamente, de las ECV y la diabetes alcanzaron los \$18 billones en China, \$ 11 billones en Rusia y \$ 9 billones en India [8]. En Sur América y el Caribe se estima que solo para el tratamiento de una ENT (diabetes), se debe disponer entre el 2 y 4 % del producto Interno Bruto (PIB), el cual representa entre el 8 y el 15% del presupuesto total para los gastos en salud [9]. Mediante un estudio macroeconómico, se demostró también, que el aumento en un 10% en la tasa de mortalidad de las ENT, estaría asociado con una disminución aproximada del 0.5 % en el crecimiento anual de la economía de un país [10].

Teniendo presente las signos y síntomas, los sistemas y/o órganos afectados y los tratamientos farmacológicos existentes para cada una de las ENT, era bastante lógico documentar y tratar cada una de estas enfermedades por separado [11]. No obstante existe un consenso creciente, basado en la evidencia, en donde se estipula que las ENT presentan algunos aspectos en común, más que simplemente la definición de sus siglas [6]. Así, las ENT han tomado nombres complementarios asociados principalmente a los factores de

riesgo comúnmente relacionados con estas enfermedades: enfermedades crónicas relacionadas con la edad y enfermedades relacionadas con el estrés oxidativo y la inflamación, son ejemplos de algunos de los nombres más reportados [6,12–15].

Desde una perspectiva social, el aumento en la expectativa de vida, el asentamiento en grandes urbes y la occidentalización del estilo de vida, han contribuido con la incidencia y prevalencia de estas enfermedades [6]. Pero sin duda alguna, son los factores de riesgo comportamentales las causas atribuibles más reconocidas en favorecer la aparición de las ENT, destacándose el consumo de tabaco, el abuso en el consumo de alcohol, la inactividad física y la dieta no saludable [1,16]. A tal punto que estos factores son considerados como los principales focos de intervención en la prevención de estas enfermedades [5,8,17], y están directamente relacionados con la aparición de los principales cambios fisiológicos/metabólicos detectados en las ENT, como son el incremento de la presión arterial, el sobrepeso/obesidad y las hiperglicemias e hiperlipidemias [1,16].

Además de la relación con los factores de riesgos, se viene estableciendo también las posibles relaciones entre las diferentes ENT a nivel de la patogénesis y sus mecanismos fisiopatológicos. Frente a este aspecto, la relación de los factores comportamentales con el proceso de envejecimiento y la contaminación ambiental, en presencia de las manifestaciones fisiológica/metabólicas (hipertensión, obesidad, hiperglicemia e hiperlipidemia), han confluído en atribuir como posibles mecanismos patológicos comunes de las ENT, a la estrecha relación existente entre la disfunción mitocondrial, el desbalance en la homeostasis redox, el estrés oxidativo a nivel del retículo endoplasmático, los daños conformacionales y funcionales de las principales macromoléculas (proteínas, lípidos y ADN), los procesos de inflamación sistémica, la resistencia a la insulina, las modificaciones a nivel epigenético y finalmente los factores genéticos. En relación a esto, son diversas las investigaciones y revisiones publicadas en donde se reportan como posibles mecanismos patológicos, las alteraciones anteriormente mencionadas en EA [18–21], EP [22,23], angiogénesis y cáncer [18,24], ECV y aterosclerosis [15,24,25], ERC [26,27], entre otras.

Por otro lado, en la actualidad existen tratamientos farmacológicos aprobados para cada una de las ENT, que en la mayoría de los casos, promueven principalmente una mitigación de los signos más característicos y de las manifestaciones fisiológicas/metabólicas (hipertensión, obesidad, hiperglicemia e hiperlipidemia), sin poder alcanzar una reversión o cura de la enfermedad. Adicionalmente, el hecho de que las ENT en su mayoría son de tipo crónico y están relacionadas con el proceso de envejecimiento; los tratamientos disponibles se caracterizan a su vez por ser prolongados (en algunos casos de por vida), de alto costo y de acuerdo a la OMS incapaces de contener el aumento de la morbilidad y mortalidad a causa de estas enfermedades [1]. Por lo cual, las principales entidades de salud en el mundo, encabezadas por la ONU y la OMS, han determinado que el camino

más viable frente a las ENT, es destinar esfuerzos y recursos para su prevención, promoviendo la disminución de la incidencia de estas enfermedades y/o la mitigación de los eventos clínicos más significativos, evitando así, la progresión de las mismas a estados patológicos más relevantes que deparen mayores recursos y generen una mayor morbilidad y mortalidad. De hecho, se postula a la prevención como una alternativa costo-efectiva frente al problema de las ENT [5,8,17,28,29]. De esta forma se plantea que para alcanzar resultados satisfactorios en un conjunto de enfermedades multifactoriales, sería necesario plantear alternativas sinérgicas que conlleven a la mitigación de los múltiples factores de riesgo asociados con las ENT. Desde este punto de vista, se requerirían acciones conjuntas desde el sector político, educativo y científico que conlleven a tratamientos integrados y accesibles a la población en general, con intervenciones conjuntas a nivel farmacológico y no farmacológico.

Como una de las alternativas, es bien conocido que los antioxidantes naturales tales como la vitamina E, la vitamina C y compuestos fenólicos, especialmente flavonoides, han sido investigados por su posible utilidad para prevenir estas enfermedades, y se ha corroborado que el consumo de alimentos o suplementos dietarios ricos en estos compuestos, se constituye como una alternativa funcional y disponible, para promover la homeostasis redox y en consecuencia una disminución del estrés oxidativo [30–32]. Los antioxidantes naturales son generalmente multifuncionales. Es así como además de estabilizar radicales libres, los antioxidantes inactivan metales de transición por quelación, reducen hidroperóxidos y especies reactivas, y modulan enzimas específicas que intervienen en la homeostasis redox [33]. Más importante aún, los antioxidantes y en especial los flavonoides pueden tener propiedades antiinflamatorias, hipolipemiantes e hipoglicemiantes. En consecuencia, existen evidencias contundentes que demuestran que el consumo prolongado de productos naturales antioxidantes, no solo proporcionan una protección frente a los eventos oxidativos involucrados en la patología de las ENT, también podrían tener implicaciones sobre el componente inmunoinflamatorio y en la mitigación de las manifestaciones fisiológicas/metabólicas de las ENT (obesidad, hiperglicemia, hiperlipidemia e hipertensión) [34–40].

En ese sentido, la búsqueda de nuevas fuentes de productos naturales bioactivos, es una alternativa atractiva en países que cuentan con gran diversidad, como es el caso de Colombia. Es por tanto que la Universidad de Antioquia, a través del Grupo de Investigación en Sustancias Bioactivas, con el apoyo del Grupo de Inmunomodulación y el Grupo de Neurociencias de Antioquia, han trabajado por alrededor de 10 años, en el desarrollo de alternativas terapéuticas de origen natural para la prevención y mitigación de las ENT y sus manifestaciones clínicas asociadas, basados en la exploración y el conocimiento de nuestra biodiversidad. Como resultado de las investigaciones, se ha establecido que la especie *Garcinia madruno* (Clusiaceae) es una fuente significativa de compuestos antioxidantes

capaces de prevenir y tratar algunas de las principales ENT mediante la regulación de la homeostasis redox y la modulación a nivel inmunoinflamatorio principalmente.

En principio, derivado de una tesis doctoral, mediante un aislamiento cromatográfico de las hojas de *G. madruno* y un análisis fitoquímico por diferentes técnicas espectroscópicas, se encontraron como principales metabolitos secundarios una serie de biflavonoides, logrando aislar e identificar a partir de una fracción biflavonoide mayoritaria, a la Amentoflavona (Am), Morelloflavona (Mo) y Volkensiflavona (Vo). Adicionalmente y en menor cantidad, fueron aislados e identificados los glicósidos: Fukugisido (Fu), Espicatasido (Es) y un nuevo acetil-glucósido denominado Madrunoudeasido (Ma) [41]. En la evaluación preliminar de la actividad antioxidante, la fracción biflavonoide y los compuestos Mo, Vo y Fu presentaron una actividad antioxidante significativa, en especial inhibiendo la peroxidación lipídica de la LDL humana por el método de TBARS [42]. Los resultados obtenidos presentaron mayor actividad en comparación con el flavonoide quercetina, compuesto de referencia frecuentemente reportado como molécula con alta actividad antioxidante e inmunomoduladora [43–45].

Este hallazgo motivó a realizar una nueva investigación frente al potencial antiaterogénico y su posible efecto ateroprotector de los biflavonoides de *G. madruno*, basado principalmente, en la relación existente entre la peroxidación lipídica, la aterosclerosis y las ECV. Para lo cual se plantearon dos nuevas tesis de maestría. Como resultado de estos trabajos se encontró que los biflavonoides de *G. madruno*, *in vitro*, tienen la capacidad de modular eventos claves del proceso aterogénico, logrando actuar a nivel oxidativo, inflamatorio y celular. A nivel oxidativo los biflavonoides logran estabilizar radicales libres, inhiben la oxidación de la lipoproteína de baja densidad (LDL) y en macrófagos modulan la formación de especies reactivas del oxígeno (EROs); a nivel inflamatorio, los biflavonoides tratados con LDL oxidada (oxLDL) regulan la formación de citoquinas inflamatorias y proateroscleróticas en macrófago; y a nivel celular inhiben la expresión de receptores CD36 en macrófagos, así como la captación de oxLDL y la reducción de la carga de colesterol [46]. Por otro lado, *in vivo* en un modelo animal transgénico (apoE^{-/-}) generador de ateromas, estos compuestos demostraron tener un efecto ateroprotector e hipolipemiante, correlacionándose con los resultados obtenidos en los estudios *in vitro* [47]. Continuando con las investigaciones, la similitud en los factores de riesgo y los mecanismos patológicos de las ENT, motivaron la realización de una nueva tesis de maestría, en donde, mediante la utilización de un modelo animal triple transgénico para la EA, generador de los principales marcadores histopatológicos (placas β -amiloides y ovillos neurofibrilares), se demostró que los biflavonoides poseen un efecto neuroprotector, evitando la muerte neuronal, disminuyendo los principales marcadores histopatológicos, así como la disfunción cognitiva y promoviendo cambios en la conducta emocional de los ratones viejos transgénicos [48].

Todos estos resultados han impulsado la idea de obtener finalmente un producto funcional comercial obtenido a partir de *G. madruno*, que sea de fácil distribución, accesible a la población y que contribuya con la problemática de las ENT. En consecuencia, se planteó la realización de una nueva investigación, que condujera al desarrollo del primer precursor de un ingrediente funcional de *G. madruno*, caracterizado por poseer un alto contenido de biflavonoides, una alta actividad antioxidante y un conocimiento detallado de la biodisponibilidad y los parámetros farmacocinéticos de sus principales constituyentes. Con el objetivo, a corto plazo, de brindar la información necesaria para abordar estudios de eficacia *in vivo* por una vía de administración oral, permitiendo una aproximación posológica adecuada, y a mediano plazo, promover estrategias para el escalado en su producción y desarrollar todas las actividades adicionales pertinentes, en pro de obtener un extracto rico en biflavonoides de *G. madruno* reconocido como FD&C (food, drug and cosmetic) de acuerdo a los lineamientos de la FDA (Food and Drug Administration). Este extracto podría finalmente ser introducido como ingrediente o principio activo funcional en formulaciones de la industria alimentaria y/o fitofarmacéutica, constituyéndose como una terapia complementaria en la prevención, protección y/o tratamiento de algunas ENT.

2 MARCO TEÓRICO

2.1 RADICALES LIBRES Y ESPECIES REACTIVAS: IMPORTANCIA A NIVEL PATOLÓGICO Y FISIOLÓGICO

En el campo de la química, los radicales libres (RLs) fueron descritos ya hace más de un siglo [49]. Para ese tiempo era improbable pensar que estos podrían hacer parte de sistemas biológicos dada su reactividad y corto tiempo de vida. Sin embargo, fue alrededor de 1950 cuando se logró encontrar RLs en sistemas biológicos [50]. Desde ese momento hasta la actualidad, se han desarrollado diversas investigaciones relacionando sus propiedades fisicoquímicas con la función de los RLs en sistemas fisiológicos [51]. En principio, a los RLs se les determinó únicamente un rol patológico asociados a procesos deletéreos causados por su reactividad y capacidad oxidativa. Al transcurrir el tiempo, se encontró también un papel funcional, principalmente en la modulación de procesos de señalización celular y como mecanismos de protección sobre agentes infecciosos [52,53].

Actualmente la dualidad patogénica y funcional de los RLs se mantiene vigente, razón por la cual, el conocimiento sobre su rol específico, se constituye como uno de los campos más dinámicos y en creciente aumento en la investigación mundial en temas relacionados con la salud humana y específicamente en lo que respecta a las ENT.

2.1.1 Características de los radicales libres y especies reactivas

Las especies reactivas (ERs) comprenden los principales RLs y especies oxidativas no radicalarias de mayor relevancia a nivel fisiológico. Un RL es una molécula o fragmento de molécula que contiene uno o más electrones desapareados en el orbital externo de uno de sus átomos y que se caracteriza por ser menos estable y más reactivo que las ERs no radicalarias [31]. Las ERs se producen principalmente a partir de formas reducidas del oxígeno y el nitrógeno. Cualquier RL o ER no radicalaria que involucre oxígeno o nitrógeno puede ser referida como: Especies Reactivas del Oxígeno (EROs) y especies reactivas del nitrógeno (ERNs), respectivamente [54]. En la Figura 1 se presentan las principales ERs de interés biológico.

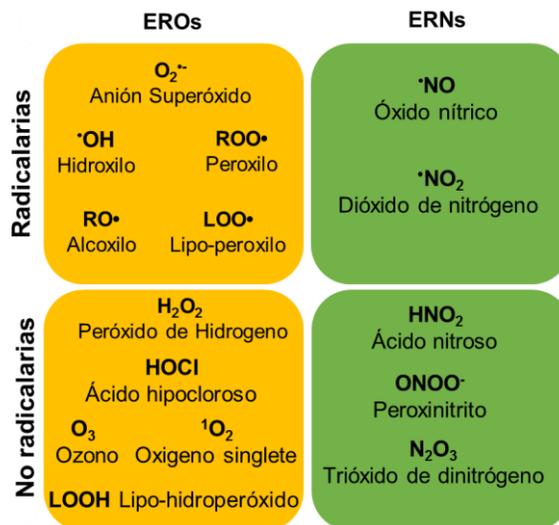


Figura 1. Principales especies reactivas radicalarias y no radicalarias de interés fisiológico.

El anión superóxido ($O_2^{\cdot-}$) es la EROs más abundante, su concentración fisiológica es de alrededor de $10 \mu M$ y en comparación con otras EROs, el $O_2^{\cdot-}$ presenta un tiempo de vida relativamente alto. Su denominación como “súper-óxido” no está relacionada por su alta capacidad oxidativa en sí, sino por su alta producción y capacidad de formar nuevas EROs. De hecho, el $O_2^{\cdot-}$ es denominado como el RL primario, del cual se obtienen la mayoría de EROs, mediante la interacción del $O_2^{\cdot-}$ con otras moléculas, ya sea de forma directa o mediada por procesos enzimáticos. El peróxido de hidrogeno (H_2O_2), el radical hidroxilo ($\cdot OH$) y los radicales peroxilo ($ROO\cdot$), alcoxilo ($RO\cdot$) y lipo-peroxilo ($LOO\cdot$), se constituyen como los principales EROs derivados del $O_2^{\cdot-}$ [55].

El H_2O_2 es normalmente tóxico a nivel celular en concentraciones entre 10 y $100 \mu M$. A nivel fisiológico, el H_2O_2 es producido principalmente por la dismutación enzimática o espontánea del $O_2^{\cdot-}$ [56]. A pesar de que el H_2O_2 es un débil agente oxidante y reductor y que su reactividad a nivel fisiológico es relativamente baja, la interacción del H_2O_2 con metales como el hierro y el cobre promueve la formación del radical hidroxilo, una especie mucho más reactiva y potencialmente dañina. El $\cdot OH$ a pesar de presentar una corta vida (alrededor de $10^{-3} \mu s$), es capaz de reaccionar rápidamente con casi cualquier tipo de molécula presente en las células: azúcares, proteínas, lípidos, ADN, ácidos orgánicos, entre otros. De hecho el $\cdot OH$ es actualmente la EROs más reactiva conocida [55].

Los radicales peroxilo ($ROO\cdot$) y alcoxilo ($RO\cdot$), son agentes oxidantes significativos. Se caracterizan por ser el producto radicalario obtenido de una reacción previa entre un RL y una molécula orgánica, por ello pueden ser de tipo alifático, aromático o provenir de grupos

específicos, como los lípidos dando lugar a los radicales denominados como lipo-peroxilos ($\text{LOO}\cdot$).

El oxígeno singlete y el ozono, son otras EROs de alta relevancia a nivel biológico. Se caracterizan por ser formas del oxígeno molecular altamente oxidantes. El $^1\text{O}_2$ tiene un tiempo de vida en agua del alrededor de $3.8 \mu\text{s}$ y se ha demostrado su reactividad y potencial daño frente a las principales macromoléculas fisiológicas. En sistemas biológicos es producido a partir de dos rutas principales: reacciones de foto-excitación (dependientes de luz) y reacciones de quimio-excitación (no dependientes de luz). Por foto-excitación el $^1\text{O}_2$ puede ser formado a partir de innumerables constituyentes celulares, fármacos y material particulado proveniente de ambientes contaminados. Por quimio-excitación el $^1\text{O}_2$ es generado a partir de reacciones enzimáticas y como productos o subproducto derivado de las principales reacciones en donde se involucran las EROs y ERNs [57–59] (Figura 2 - reacción 13). Por otro lado el O_3 , es un gas bastante reactivo, que se considera como EROs de origen externo, ya que su implicación patológica se relaciona principalmente con los niveles de O_3 inhalados [60].

Otras especies reactivas de importancia fisiológica son las ERNs, entre estas, el óxido nítrico ($\cdot\text{NO}$) es la ERNs más importante. El $\cdot\text{NO}$ es una molécula paramagnética y a su vez un radical libre [55]. A nivel fisiológico es uno de los RL al que se le atribuye un efecto dual a nivel benéfico y patológico [61,62]. El $\cdot\text{NO}$ se caracteriza por interactuar con una gran cantidad de sistemas biológicos, constituyentes celulares y otras ERs, esto se debe principalmente a sus características lipofílicas, las cuales le confiere la capacidad de atravesar una serie de membranas celulares, siendo biodisponible a nivel extracelular, intracelular e inclusive en organelas específicas. Por lo tanto, al igual que el $\text{O}_2^{\cdot-}$, el $\cdot\text{NO}$ puede ser considerado como la ERNs primaria, precursora de las otras ERNs de interés fisiológico. Entre las principales ERNs secundarias se destacan: el peroxinitrito (ONOO^-), el dióxido de nitrógeno ($\cdot\text{NO}_2$) y el trióxido de nitrógeno (N_2O_3).

2.1.2 Generación, conversión y eliminación de ERs en sistemas fisiológicos.

A nivel mitocondrial, los organismos que viven bajo condiciones aerobias, reducen más del 90% del oxígeno consumido directamente a agua por la acción de la citocromo oxidasa mitocondrial, último eslabón (complejo IV) en la cadena transportadora de electrones (CTE), mediante el mecanismo que involucra el paso de 4 electrones por la liberación de 4 hidrógenos [54]. Este proceso se realiza sin la formación de ninguna EROs (Figura 2- reacción 1). Por otra parte, menos del 10% del oxígeno consumido es reducido mediante la reacción con un único electrón proveniente principalmente de una fuga en la CTE en alguna de las moléculas transportadoras (coenzima Q, citocromos, flavoproteínas, entre otras.). Como resultado el oxígeno molecular circundante es transformado en $\text{O}_2^{\cdot-}$ por la interacción

con el electrón fugado (Figura 2-reacción 2) [63–65]. Se estima que la producción mitocondrial del $O_2^{\cdot-}$ a través del mecanismo del electrón fugado, representa hasta un 90 % de la producción total de EROs en condiciones normales en una célula eucariota [54]. Adicionalmente, menores cantidades de $O_2^{\cdot-}$ son producidas en otras organelas y mediante otros mecanismos. Entre los más significativos se destacan: las fugas de electrones en la CTE localizadas en las membranas nucleares, plasmáticas y en el retículo endoplasmático (RE), así como una variedad importante de oxidasas, entre estas son importantes: la familia de enzimas del Citocromo P450, la xantina oxidasa (XO) y la NADPH oxidasa (NOX). Las reacciones oxidativas mediadas por el citocromo P450 se constituyen como la principal fuente en la producción de $O_2^{\cdot-}$ a nivel de RE; el rol fisiológico de la XO en la homeostasis redox es bastante significativo convirtiéndose en la principal fuente de EROs bajo condiciones de hipoxia [66,67]. Sin embargo es la NOX la enzima más representativa, por ser la principal fuente de producción de $O_2^{\cdot-}$ y EROs bajo un mecanismo controlado a nivel bioquímico y espacio-temporal. La NOX a nivel fisiológico participa en procesos de: diferenciación, crecimiento, proliferación, apoptosis, regulación, migración y contracción celular, entre otros. [68] (Figura 3).

Una vez formado el $O_2^{\cdot-}$ por cualquiera de los mecanismos y en los lugares expuestos, espontánea o enzimáticamente, este es transformado a H_2O_2 , mediante un mecanismo denominado como dismutación (Figura 2-reacción 3). La enzima encargada de realizar este proceso es la superóxido dismutasa (SOD), la cual es considerada como el primer mecanismo de regulación de ERs a nivel celular, que se caracteriza por presentar diferentes isoformas distribuidas específicamente a nivel mitocondrial, citosólico y extracelular [56,69]. Mediante el mecanismo de reacción de Fenton, el H_2O_2 interacciona con un electrón proveniente principalmente de metales de transición en su forma reducida (Fe^{2+} y Cu^+) formando el radical $\cdot OH$ (Figura 2-reacción 4).

El radical $\cdot OH$, a su vez puede interactuar con un electrón más en conjunto con un protón, obteniendo como resultado una molécula de agua (Figura 2-reacción 5). Este proceso a nivel biológico implica normalmente la sustracción de un átomo de hidrogeno de diferentes moléculas tales como: lípidos, proteínas, ácidos nucleicos, carbohidratos y ácidos orgánicos, obteniendo RLs altamente reactivos que en presencia de oxígeno molecular dan lugar a radicales de tipo peroxilo (ROO^{\cdot}) y posteriormente a hidroperóxidos orgánicos ($ROOH$) capaces de generar una reacción en cadena, que termina por producir el daño oxidativo por la pérdida de la funcionalidad de las moléculas oxidadas. Como ejemplo, en la Figura 2-reacción 5, se muestra el proceso de peroxidación lipídica aplicable para ácidos grasos insaturados como fuente oxidable susceptible al ataque radicalario del $\cdot OH$.

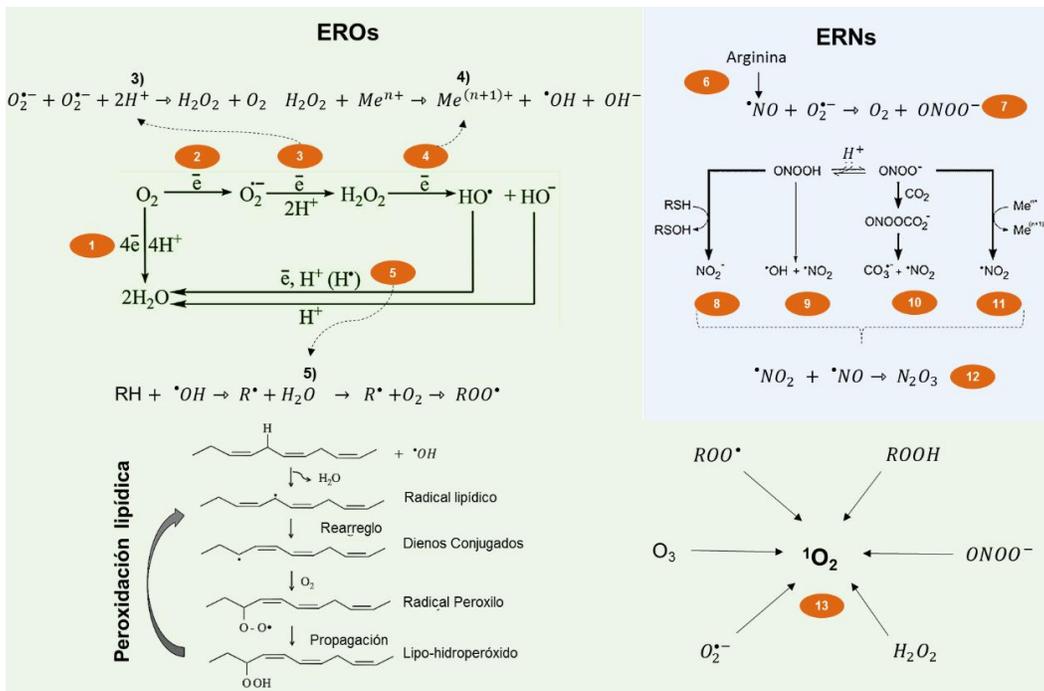


Figura 2. Formación y conversión de EROs y ERNs a partir de los radicales libres primarios: O₂^{•-} y •NO.

En cuanto a las ERNs, una vez formado el radical óxido nítrico ($\bullet NO$) por el conjunto de enzimas óxido nítrico-sintetasa (NOS) a partir de la arginina (Figura 2-reacción 6), este reacciona rápidamente con el $O_2^{\bullet -}$ presente, dando lugar al peroxinitrito, una ERN no radicalaria de gran injerencia en los procesos biológicos (Figura 2-reacción 7). Esta reacción se ve favorecida incluso en presencia de la enzima SOD, debido a que la formación de $ONOO^-$ presenta una cinética de reacción mucho mayor que la de la dismutación del $O_2^{\bullet -}$. A nivel fisiológico, el peroxinitrito puede presentarse bajo su forma aniónica ($ONOO^-$) o protonada ($ONOOH$) de acuerdo al pH fisiológico en el que se encuentre. A un pH de 7.4 alrededor del 80% el peroxinitrito se encontrará bajo su forma aniónica y a un pH de 6.2 (Ej. dentro de un fagosoma en un macrófago), más del 80 % estará en su forma protonada. De esta forma, la estabilidad, reactividad, capacidad para permear membranas, influencia fisiológica y reacciones que dan lugar a otras ERNs son diferentes para cada una de las formas del peroxinitrito. Por ejemplo: el $ONOOH$ actúa principalmente como agente oxidante, promoviendo la oxidación de grupos tioles a sus respectivos derivados de ácidos sulfénicos, y como resultado se obtiene el anión nitrito (NO_2^-) (Figura 2-reacción 8). Entre los principales compuestos oxidables por este mecanismo se destacan el glutatión y la cisteína en su forma libre o como residuo en péptidos y proteínas. En menor medida que la oxidación de tioles, el $ONOOH$ como cualquier otro peróxido, también puede sufrir un proceso de homólisis dando como resultado los RL: $\bullet OH$ y $\bullet NO_2$ (Figura 2-reacción 9). Por

otro lado, el peroxinitrito en su forma aniónica puede actuar como nucleófilo reaccionando directamente con el CO_2 , obteniendo un aducto (ONOOCO_2^-), el cual se caracteriza por ser un peróxido que rápidamente es homolizado formando los RL: $\cdot\text{NO}_2$ y $\text{CO}_3^{\cdot-}$, este último una ER del carbono (Figura 2-reacción 10). Adicionalmente el ONOO^- también puede actuar como oxidante secundario, interactuando con metales de transición presentes en metaloproteínas (Mn-SOD y hemoproteínas), obteniendo el RL $\cdot\text{NO}_2$ y un complejo OXO-Metal altamente oxidante (Figura 2-reacción 11). Finalmente a nivel de la producción de ERNs, el RL $\cdot\text{NO}_2$ obtenido en las reacciones 9, 10 y 11 en presencia del RL $\cdot\text{NO}$ da lugar al N_2O_3 , una ER no radicalaria y altamente relacionada en procesos de nitración del ADN [70].

La regulación homeostática de las ERs, es un proceso dinámico y coordinado a nivel celular que normalmente involucra los procesos de producción y eliminación simultánea de ERs. Por tanto la conversión de una especie, normalmente estará asociada a la eliminación de la misma y a la formación de una nueva. Entre los mecanismos regulatorios se destacan los endógenos y los exógenos. A nivel endógeno existen dos mecanismos principales: las reacciones de conversión/eliminación producidas espontáneamente de acuerdo a la cinética de reacción y la disponibilidad de los reactantes (Figura 2) y aquellas mediadas por un conjunto de enzimas dispuestas a nivel extracelular, citosólico y en algunas organelas específicas, las cuales convierten de forma secuencial el $\text{O}_2^{\cdot-}$ producido, en agua molecular (Figura 3).

El $\text{O}_2^{\cdot-}$ producido por la CTE a nivel mitocondrial; el producido por el RE, la XO y la NOX a nivel citosólico; y el $\text{O}_2^{\cdot-}$ producido por la NOX a nivel extracelular, es dismutado rápidamente a H_2O_2 por acción de la SOD1, SOD2 y SOD3, respectivamente [69]. Para evitar las diferentes reacciones que dan entre el H_2O_2 , los metales de transición y el $\cdot\text{NO}$ en la formación de nuevas ERs, el H_2O_2 es transformado a agua por acción de la catalasa (CAT) y peroxidasa, especialmente aquellas dependientes de glutatión (GPX). La CAT, es una enzima característica de los mamíferos que se encuentra principalmente a nivel intracelular en los eritrocitos y en los peroxisomas de células del hígado y en menor medida del riñón [71]. Como mecanismo catalítico, la CAT transforma dos moléculas de H_2O_2 produciendo dos moléculas de agua y una de oxígeno molecular [72]. Otra vía existente para la reducción del H_2O_2 es mediante el conjunto de enzimas GPXs. Estas enzimas se localizan principalmente en el citosol y mediante la utilización del glutatión reducido (GSH) como cofactor, reducen el peróxido de hidrógeno y los peróxidos orgánicos a agua o alcoholes, a costa de la oxidación del GSH en glutatión oxidado (GSSG). Como mecanismo regulatorio, el GSSG formado es regenerado a GSH mediante la acción de la glutatión reductasa (GR). El GSH además de poseer un rol como cofactor, puede reaccionar directamente con ERs, como el: ONOO^- y el $\cdot\text{OH}$, y con productos radicalarios tóxicos generados a partir del metabolismo de xenobioticos. Razón por lo cual el GSH es

reconocido como el principal agente antioxidante de bajo peso molecular y de origen endógeno [73].

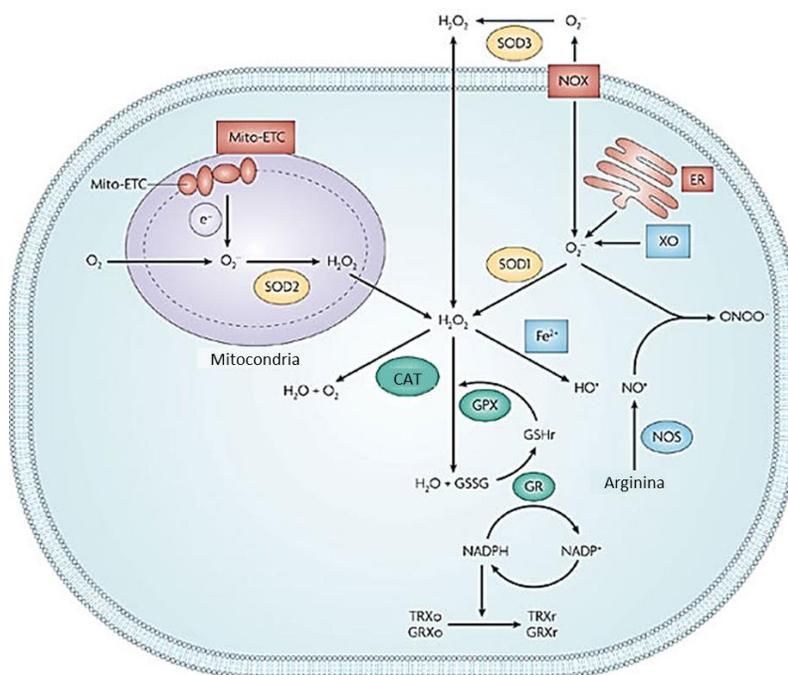


Figura 3. Regulación homeostática en la producción, conversión y eliminación de ERs. Modificado de [69]

Como alternativa de los mecanismos regulatorios endógenos, la eliminación y conversión de ERs, puede estar mediada por moléculas exógenas de bajo peso molecular, provenientes principalmente de la dieta. Dada sus características estructurales, estas moléculas tienen la posibilidad de actuar como agentes antioxidantes estabilizando las principales ERs formadas. Entre los compuestos más representativos se encuentran las vitaminas C (ácido ascórbico) y E (tocoferol), carotenoides, flavonoides, antocianinas y ácidos clorogénicos, ya sea en su forma libre o como productos metabólicos de reacciones de fase I o II.

2.1.3 Estrés oxidativo: clasificación e implicación de las ERs en procesos fisiológicos y patológicos

Teniendo presente la estrecha relación existente entre los procesos concomitantes de generación, conversión y eliminación de las ERs, en conjunto con los mecanismos articulados para su regulación, es de esperarse que los organismos vivos en un estado basal presenten y mantengan niveles bajos de ERs. Sin embargo, bajo ciertas circunstancias este balance puede verse afectado posibilitando el aumento de la

concentración de ERs y la subsecuente aparición del “estrés oxidativo”. Entre los factores más preponderantes se destacan: i) el aumento de sustancias endógenas y/o exógenas prooxidantes-autooxidantes que promuevan la generación de ERs; ii) la reducción de las reservas de antioxidantes de bajo peso molecular; iii) la inactivación de las enzimas antioxidantes; iv) la disminución en la producción de enzimas antioxidantes y antioxidantes de bajo peso molecular; y finalmente v) la combinación de dos o más de estos factores mencionados [54].

El término estrés oxidativo, asociado con el proceso “redox” a nivel biológico, fue introducido hace 30 años y desde ese momento hasta la actualidad ha tenido variaciones en su definición [74]. En principio, fue definido como “Una alteración en el equilibrio prooxidante - antioxidante en favor de los primeros” [75]. Con el tiempo, el concepto fue transformándose, contemplando las implicaciones fisiológicas y patológicas atribuidas a las ERs, y se planteó la siguiente definición: “Un desequilibrio entre prooxidantes y antioxidantes en favor de los prooxidantes dando lugar a una interrupción en el proceso de señalización redox y/o promoviendo un daño molecular” [76]. En la actualidad este concepto se ha fragmentado cada vez más, tipificando al estrés oxidativo conforme a la concentración de ERs y el impacto a nivel biológico que esto implica. En la Figura 4 se esquematiza las diferentes fases del estrés oxidativo conforme al contenido de ERs en el tiempo y su respectiva relevancia fisiológica.

En un estado estacionario (Figura 4-A), la producción y eliminación de ERs estaría bajo control mediante los mecanismos regulatorios existentes, alcanzando concentraciones basales constantes. De acuerdo a lo reportado, en este periodo el rol fisiológico de las ERs está relacionado principalmente con la modulación de los procesos de señalización intracelular y la regulación de numerosas respuestas biológicas y fisiológicas. Entre las más importantes se encuentran: señalización de los factores de crecimiento, transducción de la señal hipóxica, autofagia, respuestas inmunes, y proliferación y diferenciación celular. Los peróxidos y en especial el H_2O_2 en concentraciones nano molares, son las ERs más relacionadas con los procesos de señalización celular, esto es debido principalmente a la capacidad que tienen estas ERs de oxidar los grupos tioles de los residuos de cisteína de proteínas y de enzimas como fosfatasas, desencadenando los diferentes procesos asociados. No obstante, no se ha establecido con certeza los mecanismos de señalización en donde intervienen algunas ERs, y más aún, el mecanismo que confiere una especificidad al proceso, evitando al mismo tiempo la oxidación de otras macromoléculas adyacentes o la formación de ERs más reactivas y tóxicas como el $\cdot OH$, que por consiguiente den lugar a procesos oxidativos de tipo patológico [61,68,77]. Adicionalmente, el rol fisiológico de las ERs tales como $O_2^{\cdot -}$ y el H_2O_2 se ve reflejado también en patologías asociadas con alguna alteración en la expresión y funcionalidad de alguna isoenzima del complejo NOX principalmente. Como consecuencia, existen patologías asociadas a inmunodeficiencias y

disfunción tiroidea (hipotiroidismo), atribuibles a una reducción en la producción de ERs [78,79].

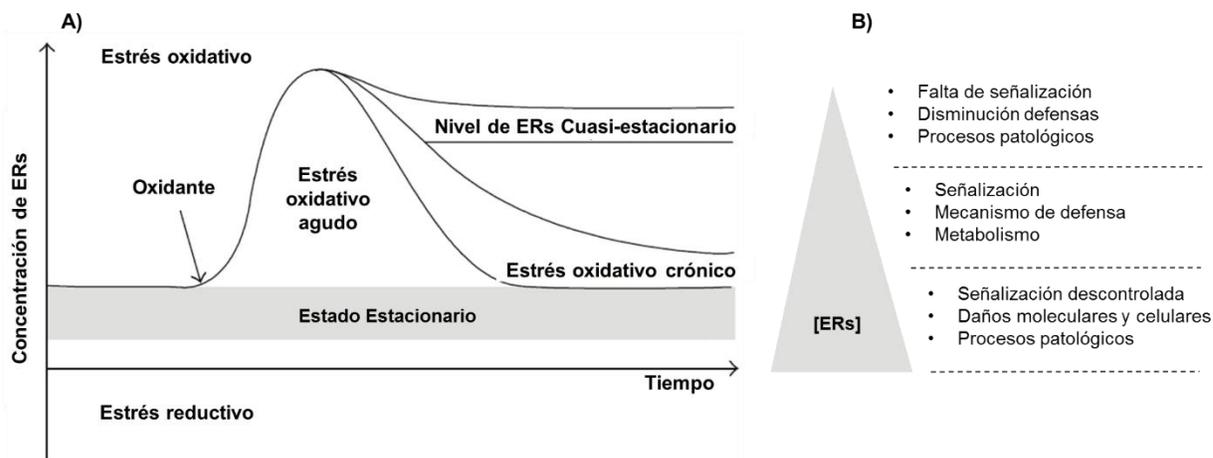


Figura 4. Contenido dinámico de ERs en el tiempo, clasificación del estrés oxidativo (A) e implicaciones en procesos fisiológicos y patológicos (B). Modificado de [54,73]

Por otro lado y debido a muchos factores, la concentración de ERs puede verse incrementada de forma significativa, alcanzando rápidamente valores superiores al estado estacionario (Figura 4-A). Si los mecanismos regulatorios se encuentran disponibles y en cantidades suficientes, dichos niveles de ERs pueden disminuirse a estados basales en un corto tiempo. Esta fase se conoce como “estrés oxidativo agudo” y normalmente no está asociado a procesos deletéreos. Como ejemplo se encuentra el estrés oxidativo asociado con el ejercicio aeróbico agudo, en el cual se ha encontrado un aumento considerable en la producción de $\cdot\text{NO}$ y en menor medida $\text{O}_2\cdot^-$ y H_2O_2 . El aumento de estas ERs, en estos casos, está relacionado con procesos de vasodilatación y mejoramiento de la función endotelial [80,81].

En algunos casos, no obstante, la maquinaria antioxidante celular disponible no tiene la capacidad de neutralizar el aumento en la cantidad producida de ERs a niveles estacionarios (estrés oxidativo crónico y estrés oxidativo cuasi-estacionario Figura 4-A). El aumento en los niveles de ERs y principalmente el mantenimiento de estos en el tiempo promueven así una cascada oxidativa, en donde se ve aumentada la producción, principalmente de las ERs más tóxicas como el $\cdot\text{OH}$ y el $\text{ONOO}\cdot$. Como resultado, la carencia de enzimas antioxidantes y antioxidantes de bajo peso molecular capaces de neutralizar dichas especies, conlleva a la oxidación de componentes celulares adyacentes, a la disfunción de organelas vitales como la mitocondria y retículo endoplasmático, y a la modulación de procesos inflamatorios, que en conjunto con otros factores, han sido

ampliamente relacionados con la aparición y/o exacerbación de ENT como el: cáncer, ECV, ERC, END, osteoporosis, entre otras [12–15,18–27,64].

2.2 COMPUESTOS FENÓLICOS Y SU ROL EN LA SALUD HUMANA

Los compuestos fenólicos son un grupo de metabolitos secundarios heterogéneo comprendido por cientos de diferentes compuestos. El término “compuesto fenólico” que actualmente se utiliza de forma indistinta con el término “polifenol”, se refiere a una amplia categoría de metabolitos de origen natural que contienen uno o más hidroxilos de tipo fenólico en su estructura. Entre la variedad existente, se destacan desde estructuras simples como el ácido salicílico, hasta compuestos poliméricos complejos como la suberina o lignina [12]. De hecho, existen al menos 15 grupos de polifenoles diferentes, clasificados principalmente de acuerdo al número de anillos fenólicos que contengan y a los elementos estructurales que se unen a estos anillos [82]. Entre los principales grupos se destacan: ácidos hidroxicinámicos, estilbenos, flavonoides, taninos, lignanos entre otros. En la actualidad los compuestos fenólicos son ampliamente reconocidos como la principal fuente de compuestos antioxidantes de la dieta [83]. Se encuentran ampliamente distribuidos en una gran variedad de alimentos y especies vegetales, estando además de una forma diferencial en las diferentes partes de la planta [84]. La actividad antioxidante en conjunto con otros efectos biológicos atribuidos a estos compuestos, han posicionado a los polifenoles como uno de los grupos de metabolitos secundarios más prominentes y de mayor importancia en la salud pública mundial [85].

Teniendo presente el concepto de salud pública [85] y promoción de la salud [86], en lo que concierne a los polifenoles, existen evidencias que soportan sus potenciales beneficios en la salud, especialmente previniendo enfermedades de alto impacto a nivel de la salud pública como es caso de las ENT [85]. De hecho, la eficiencia de algunos polifenoles ha sido demostrada a nivel de prevención primaria y secundaria principalmente. De forma general: la prevención primaria busca prevenir una enfermedad o una condición de salud no deseada antes que ella ocurra, por su parte la prevención secundaria tiene como objetivo evitar el progreso de una enfermedad ya establecida, y por último la prevención terciaria busca reducir las limitaciones y discapacidades generadas a causa de la enfermedad [87,88].

Es así como múltiples estudios epidemiológicos se han llevado a cabo con el objetivo de identificar los beneficios en salud del consumo de polifenoles, ya sea mediante la ingesta de alimentos o suplementos dietarios. Con relación a las ECV, estudios de cohorte determinaron en una población de 1507 personas, que un consumo entre 120-599 ml de té verde por día disminuía en un 46% el riesgo de desarrollar hipertensión [89]. A su vez siete

estudios de cohorte prospectivos revelaron efectos protectores y preventivos de flavonoides con respecto a la mortalidad asociada con las enfermedades coronarias, reduciendo hasta en un 65% el riesgo de mortalidad [90]. Entre estos se destacan: la disminución de la mortalidad asociada con la adherencia a dietas saludables como la dieta mediterránea (rica en compuestos fenólicos) [91,92], y el consumo regular de flavonoides del cacao, principalmente. Este último ha sido comprobado tanto por estudios epidemiológicos como ensayos clínicos, lográndose demostrar una reducción en la incidencia de ECV y una disminución en la muerte asociado con eventos agudos como infarto del miocardio y accidentes cerebrovasculares [93]. Adicionalmente los ensayos clínicos han demostrado una disminución de los factores de riesgo, mitigando procesos como la hipertensión [94,95], la disfunción endotelial [96,97], las dislipidemias [98,99] y la resistencia a la insulina [100,101].

En lo concerniente a las enfermedades neurodegenerativas y específicamente con respecto al deterioro cognitivo, un estudio prospectivo denominado PAQUIUD realizado en una ventana de tiempo de 10 años sugiere: i) que la ingesta constante de flavonoides en la dieta estaría asociada con un menor deterioro cognitivo en sujetos de 65 años o más; y ii) que el consumo regular de vino, alrededor de tres copas diarias, estaría asociado con una disminución de alrededor del 80% en la incidencia de demencia y EA comparado con las personas que consumen menos o no lo consumen [102]. Resultados similares fueron encontrados para flavonoides relacionados con el consumo regular de bayas [103]. Por lo tanto, los resultados epidemiológicos presentan las evidencias entre el consumo regular de polifenoles y la prevención primaria de las END. Con respecto a la prevención secundaria, los resultados obtenidos en los ensayos clínicos realizados, una vez establecida la enfermedad, no son del todo concluyentes [104,105], por lo cual se establece que el consumo de polifenoles en estados patológicos, si bien no asegura una mejora o reversión de la EA, reflejado en una mejora cognitiva, tampoco se refuta este hecho por completo. Una posible explicación entre los resultados obtenidos a nivel epidemiológico y a nivel clínico podría estar en que el estrés oxidativo inicia en estados tempranos de la enfermedad y sus consecuencias a nivel del ADN, lípidos, proteínas, mitocondria, retículo endoplasmático y en general a nivel celular, establecen un punto de no retorno [105]. A manera de resumen, la Figura 5 esquematiza el rol de los polifenoles en la promoción de la salud humana, tomando como base la actividad antioxidante y antiinflamatoria, y como desde estas, en conjunto con otros eventos claves de los procesos fisiopatológicos en donde igualmente intervienen los compuestos fenólicos, se impacta en la prevención primaria y secundaria de las ENT.

Actividad Antioxidante e inflamatoria

- ✓ Actividad captadora de radicales libres [33]
- ✓ Quelación de metales [262]
- ✓ Regulación enzimática (SOD-GPX-CAT-eNOS Vs XO-NOX) [259]
- ✓ Inhibición enzimática (COX-LOX) [263]
- ✓ Modulación de citoquinas proinflamatorias y de factores de transcripción (NF-κB) [263]



- ✓ Regulación de la homeostasis Redox (mitigación del estrés oxidativo)
 - ✓ Modulación en la expresión de genes
 - ✓ Modulación de vías de señalización
- Promueve la prevención primaria y secundaria de las ENT**

Enfermedades cerebrovasculares, síndrome metabólico y diabetes

- ✓ Activación, Inducción y aumento en la expresión de eNOS [259]
- ✓ Inducción de factores endoteliales de relajación [259]
- ✓ Aumento de la biodisponibilidad del NO [259]
- ✓ Disminución de LDL y TAG [98,99]
- ✓ Disminución de oxLDL [99]
- ✓ Disminución de la agregación plaquetaria [260]
- ✓ Modulación de proteasas (metaloproteinasas) [261]



Prevención Primaria:

- ✓ Disminución en la incidencia y muerte asociada con la aparición de eventos clínicos agudos derivados de las ECV

Prevención Secundaria:

- ✓ Disminución del riesgo de muerte asociado con la reaparición de eventos agudos (infartos, isquemias, entre otros)

Mediante: Ateroprotección; Mejoramiento de la función endotelial, prevención y control de la hipertensión; mantenimiento de la homeostasis lipídica.

- ✓ Inhibición de α-Amilasa y α-Glucosidasa, Inhibición de transportadores de glucosa intestinales (SGLT 1-GLUT2) [264–268]
- ✓ Incremento de la expresión de enzimas glicogénicas y disminución de enzimas gluconeogénicas [82,269]
- ✓ Aumento en la expresión de GLUT4 [82]



Prevención Primaria:

- ✓ Regulación de la digestión y absorción de glucosa a nivel intestinal [82,269]
- ✓ control del peso y prevención del síndrome metabólico y la obesidad [89,270,271]

Prevención Secundaria:

- ✓ Aumento de sensibilidad a la insulina [100,101]
- ✓ Aumento en captación de glucosa a nivel celular [82,269]
- ✓ Disminución de la gluconeogénesis y aumento de la glicogénesis [82,269]

Enfermedades neurodegenerativas (enfermedad de Alzheimer)

- ✓ Inhibición de la formación de CysDA [272]
- ✓ Activación de α-secretasa [272]
- ✓ Inhibición de la agregación β-amiloide [272]
- ✓ Modulación de la fibrilación de placas (Aβ) [272]



Prevención Primaria:

- ✓ Disminución en la incidencia de demencia y EA

Prevención secundaria:

- ✓ Disminución en el deterioro cognitivo

Figura 5. Rol fisiológico de los polifenoles en la prevención primaria y secundaria de las ENT.

2.3 GARCINIA MADRUNO Y SUS BIFLAVONOIDES

2.3.1 Distribución y aspectos botánicos de *Garcinia madruno*

Garcinia madruno (Kunth) Hammel, es una especie perteneciente a la familia Clusiaceae, también conocida como Guttiferae. Esta es una familia constituida por unos 50 géneros y alrededor de 1200 especies distribuidas mayoritariamente en zonas tropicales. El género *Garcinia* engloba numerosas especies (250 aproximadamente) distribuidas en Asia, África, Centro y Sudamérica, de las cuales 8 se encuentran en Colombia, siendo siete nativas y una introducida (*G. mangostana*) [106].

Según el Sistema de Información sobre Biodiversidad de Colombia -SIB, la especie *G. madruno*, conocida tradicionalmente con el nombre de "Madroño, Camururo, Ocoró o Charichuelo", posee una distribución altitudinal entre los 100 m a 1.500 m, con una distribución geográfica en el mundo que abarca desde Costa Rica hasta Bolivia y Brasil. En Colombia se ha adaptado a una multiplicidad de climas predominando en los templados, distribuyéndose por toda la costa pacífica hasta la cuenca amazónica. Su óptimo desarrollo lo alcanza con precipitaciones entre 1.200 y 1.500 mm anuales y temperatura media anual de 22 a 28°C. Adicionalmente se adapta bien a diferentes suelos y condiciones ambientales [107]. Su hábitat se encuentra en bosques primarios, planicies inundables o várzeas y sobre suelos arenosos. También se puede encontrar en relictos de bosque, rastrojos bajos y bordes de camino [108]. La producción de esta especie en Colombia se da bajo niveles de sub-registro por parte de los entes estatales que rigen la producción agrícola. Sin embargo, según el Instituto Colombiano Agropecuario (ICA), el establecimiento de los cultivos se está desarrollando alrededor de viveros que distribuyen materiales de siembra sobre los territorios que se extienden a lo largo del eje cafetero: en cercanías a Pereira entre las localidades de Cerritos y Morelia y en el municipio de Quimbaya; en el Departamento del Valle del Cauca, municipio de Tuluá; en el departamento del Meta, municipio de San Martín. Además, en el departamento del Tolima, municipio de Melgar. En la Figura 6 se muestra la distribución de esta especie en Colombia y el trópico americano.



Figura 6. Distribución de *G. madruno* en América. Imagen tomada de <http://www.discoverlife.org/mp/20m?r=0.2&la=-15&lo=-54&kind=Garcinia+madruno&flags=glean>:

Botánicamente, *G. madruno* se caracteriza por ser un árbol dioico de tamaño medio que alcanza hasta 15 m de altura. Sus hojas son compuestas de color verde oscuro, con forma elíptica a oblongada que producen un látex de color amarillo; en periodos de floración contienen de 1 a 15 flores amarillas en los nódulos de las ramas. Adicionalmente, posee una fruta exótica, esférica, ovoide o elipsoide con cascara gruesa, amarilla y recubierta por protuberancias, su pulpa es blanca, aromática, jugosa, de sabor agridulce, comestible, con un sabor muy parecido al mangostino, por lo que es bastante apreciado por humanos y primates, y por lo cual se elaboran jaleas y jugos con la pulpa [107,109,110] (Figura 7).

2.3.2 Aspectos fitoquímicos y terapéuticos del género *Garcinia* y de la especie *Garcinia madruno*.

El género *Garcinia* es considerado como el más grande y abundante de la familia Clusiaceae. Es nativo de las regiones de Asia, noreste de Australia, sur de África y el neotrópico Americano [111]. En vista a las interesantes propiedades biomédicas de muchas de estas especies, varias especies del género han sido el foco de atención en estudios químicos y biológicos [112,113]. Es así como estudios fitoquímicos han logrado aislar e identificar a partir de diferentes partes de especies de *Garcinia* provenientes principalmente del sudeste asiático y de África, metabolitos secundarios de gran relevancia como biflavonoides, flavonoides, benzofenonas, xantonas y ácidos orgánicos (Figura 8).

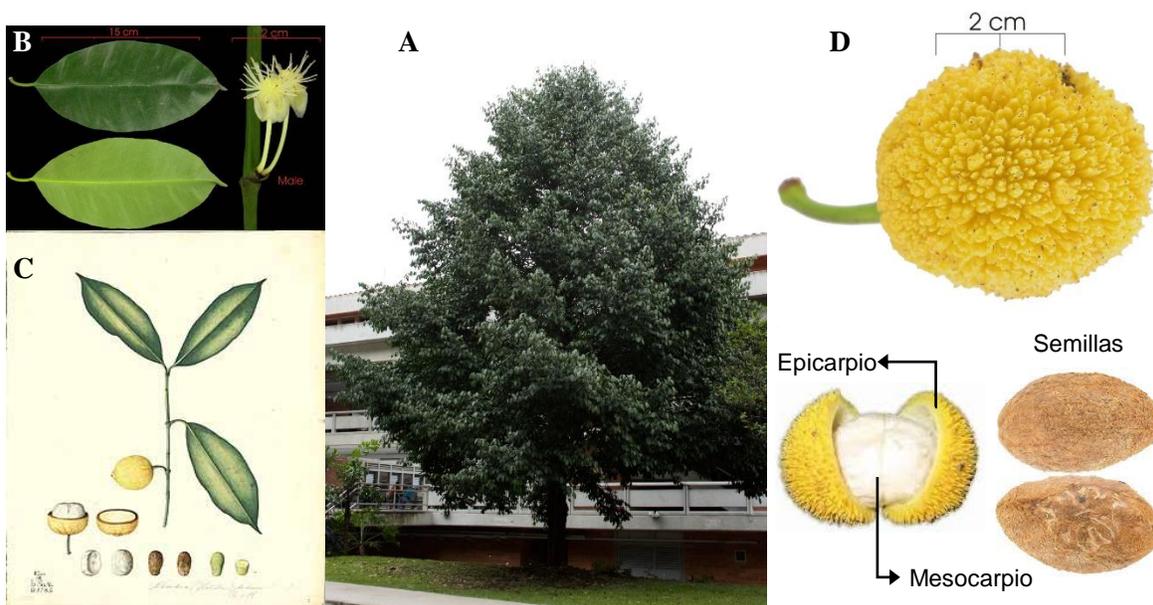


Figura 7. Descripción gráfica de la especie *Garcinia madruno* (Kunth) Hammel. Árbol (A), hojas y flores (B); representación botánica (C) y fruto (D).

Normalmente el contenido y la cantidad de compuestos presentes en las diferentes especies del género, se caracteriza por la sobreexpresión de algunos metabolitos específicos pertenecientes a uno de los grupos mencionados. Por ejemplo, las benzofenonas (Figura 8-C) son los metabolitos secundarios más abundantes en las especies: *G. xanthochymus*, *G. mannii*, *G. staudtii*, y *G. subelliptica*, donde el garcinol (5), el xantocimol (6) y las gutiferonas (se muestra gutiferona A (7)), son las moléculas más representativas de este grupo de compuestos dado su contenido y bioactividad [114,115]. En cuanto a las xantonas (Figura 8-B), la α , β y γ - mangostin (3, 4 y 5) son los compuestos mayoritarios en *G. mangostana* y a los cuales se les ha atribuido los efectos biológicos principalmente [116]. Por su parte, los ácidos orgánicos (Figura 8-A) y en especial el ácido hidroxycítrico, en su forma ácida (1) y como lactona (2), son constituyentes significativos y con alto valor agregado en los frutos de *G. cambogia* [117–119]. Finalmente los biflavonoides son los compuestos más representativos de especies como *G. kola* [120], *G. brasiliensis* [121,122] y *G. hombroniana* [111].

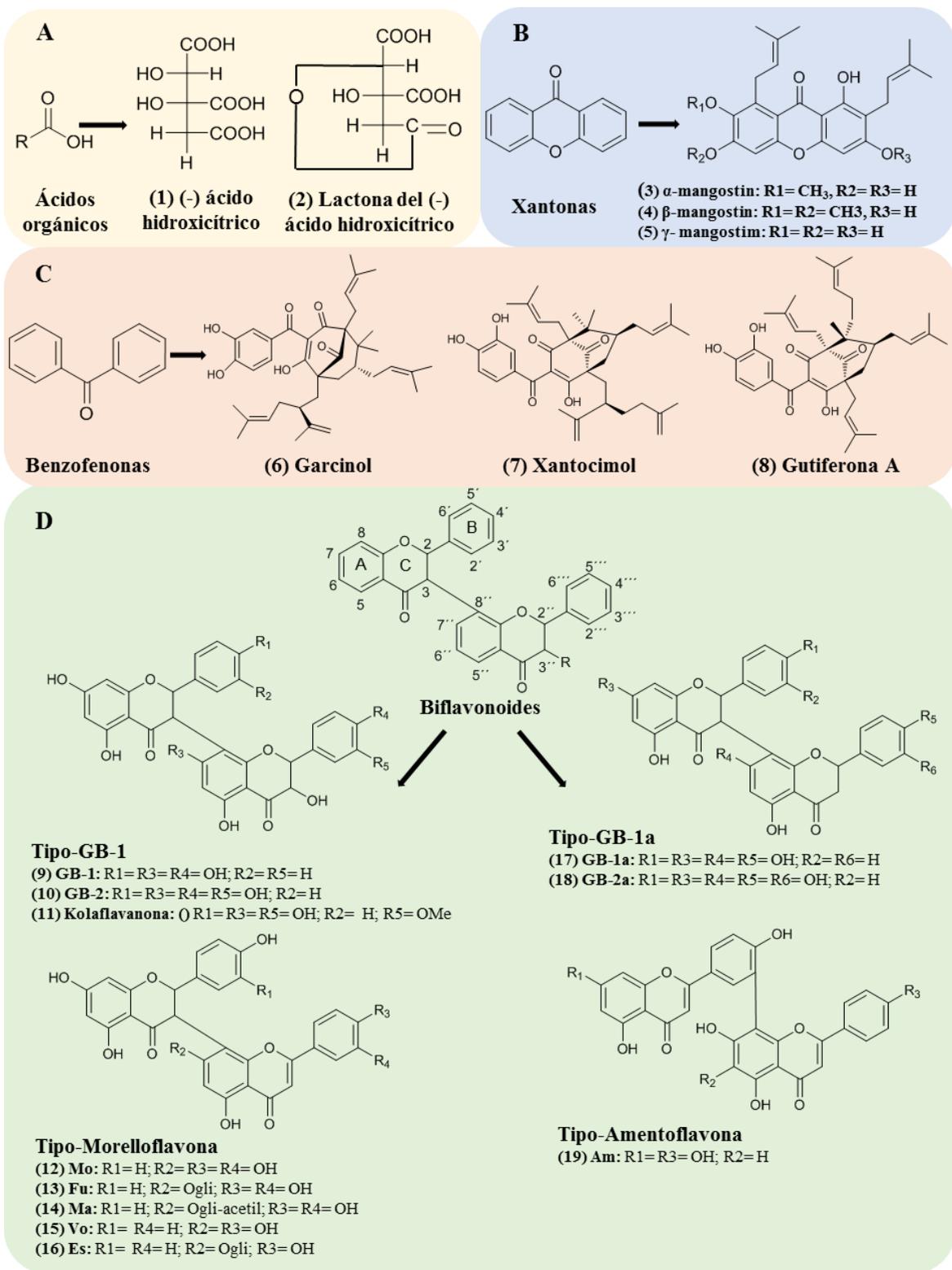


Figura 8. Principales metabolitos secundarios aislados de especies del genero *Garcinia*.

Una recopilación de datos científicos muestra que muchas de estas especies son aprovechadas en ámbitos farmacéuticos y alimentarios. De esta forma, en Asia: *G. mangostana* (conocida por su fruto el mangostino y los productos nutraceuticos derivados de este); en África: *G. kola* (reconocida por el ingrediente kolaviron extraído de sus semillas); y en América: *G. macrophylla* y *G. brasiliensis*, son especies alimentarias reconocidas por ser utilizadas de forma tradicional y a nivel comercial en la prevención o tratamiento de enfermedades como úlcera, diarrea, fiebre, hipertensión, obesidad, desordenes inflamatorios, daño hepático, entre otras enfermedades [112,115,122–131]. Sin embargo, *G. cambogia*, una planta del suroeste de Asia, es la especie referente del género, dada su importancia económica como suplemento dietario utilizado en el tratamiento de la obesidad [132–134]. Interesantemente, un número de estudios clínicos han demostrado la eficacia del ácido hidroxycítrico en el control de peso en pacientes con obesidad [133,135], postulando a esta molécula como el principio activo responsable de la bioactividad de esta última especie vegetal.

En cuanto a *G. madruno*, estudios previos desarrollados por nuestro grupo, mediante un aislamiento cromatográfico de sus hojas y un análisis fitoquímico por diferentes técnicas espectroscópicas, lograron establecer como principales metabolitos secundarios a un grupo de biflavonoides. Este estudio fitoquímico permitió la identificación de 5 biflavonoides conocidos: Amentoflavona (Am), Morelloflavona (Mo), Volkensiflavona (Vo) y los glicósidos Fukugisido (Fu) y Espicatasido (Es), y un nuevo biflavonoide acetil-glicósido denominado Madrunoudeasido (Ma) [42,110].

Químicamente, los biflavonoides se caracterizan por la unión covalente de dos unidades monoméricas de flavonoides. Estas unidades pueden ser del mismo o diferente tipo estructural, por ejemplo, mediante enlaces C-C o C-O-C pueden existir dímeros compuestos por flavanona-flavona, flavona-flavona o flavona-flavonol [136,137]. Adicionalmente estos pueden presentar diversas sustituciones, dando lugar a biflavonoides glicosidados, metilados, sulfatados, isoprenilados, entre otros [138–140]. Por lo tanto, teóricamente numerosos biflavonoides podrían existir, sin embargo, estos se encuentran distribuidos a nivel mundial, de forma restringida, solo en algunas especies vegetales. Principalmente, en especies de la familia Clusiaceae especialmente aquellas del género *Garcinia*, en las especies del genero *Selaginella* y otras como el *Ginkgo biloba* [136,137]. Actualmente los biflavonoides son clasificados de acuerdo al tipo de flavonoides que lo conforman y al tipo de unión entre estos, existiendo cinco grupos generales (Figura 8-D): i) **tipo GB-1** (flavanona-(3→8'')-flavanonol), a este grupo pertenecen principalmente los biflavonoides provenientes de *G. Kola*: GB-1, GB-2, y kolaflavanona (moléculas 9,10 y 11); ii) **tipo GB-1a** (flavanona-(3→8'')-flavanona), en este grupo se destacan los biflavonoides GB-1a (3-8''-binaringenina) y GB-2-a (3-8''-naringenileriodictiol) (17 y 18 respectivamente); iii) **tipo morelloflavona** (flavanona-(3→8'')-flavona), este grupo se constituye como uno de

los más distribuidos en el género *Garcinia*, de hecho los biflavonoides de *G. madruno*: Mo (12), Vo (15), y sus derivados glicosidados Fu (13), Es (15) y Ma (14) pertenecen a este grupo; iv) **tipo amentoflavona** (flavona-(3'→8'')-flavona) estos biflavonoides se caracterizan por presentar una unión inter-flavonoide diferente (3'→8''), en comparación con los tres grupos anteriores (3→8'), no obstante son bastante distribuidos y estudiados, siendo Am (19) su principal referente; finalmente v) **otros biflavonoides**, si bien pueden no ser un grupo como tal, en este se clasificarían todo los biflavonoides que no encajen en los grupos anteriores, ya sea por estar conformados por diferentes combinaciones de flavonoides o principalmente por presentar uniones inter-flavonoide diferentes a (3→8') y (3'→8'').

En general, a los biflavonoides se les han atribuido actividades farmacológicas diversas como agentes antimicrobianos, antialérgicos, antiinflamatorios, hepatoprotectores, antivirales y antioxidantes principalmente [116,118–128]. Respecto a la funcionalidad reportada para los biflavonoides de *G. madruno*, con excepción de Am y en menor medida Mo, los estudios en general son incipientes. Mediante dos trabajos reportados con anterioridad, los compuestos Mo, Vo y Fu presentaron una actividad antioxidante significativa, en especial inhibiendo la peroxidación lipídica de la LDL humana por el método de TBARS y estabilizando el radical DPPH' [42,110]. Los resultados obtenidos presentaron mayor actividad en comparación con el flavonoide quercetina, compuesto de referencia frecuentemente reportado como molécula con alta actividad antioxidante e inmunomoduladora [43–45]. En adición y específicamente frente a la bioactividad y probable funcionalidad de Mo, se ha reportado el efecto antioxidante, antiinflamatorio e hipolipemiante [141,142], modulando de esta forma, tres procesos fundamentales en el desarrollo patogénico de las principales ENT: el estrés oxidativo, los procesos inflamatorios y las dislipidemias [3,6,15,24,63,64]. De hecho, frente a una de las principales ENT como los son las enfermedades cardiovasculares derivadas principalmente del proceso aterogénico. De acuerdo a los reportado por [143], la administración de Mo por vía oral usando como vehículo el alimento en un modelo animal transgénico proaterogénico, demostró que tras un tratamiento prolongado, Mo provee un efecto ateroprotector significativo, postulando así, a Mo y a sus derivados como posibles agentes orales funcionales, especialmente como terapia complementaria en la prevención primaria y secundaria de enfermedades cardiovasculares derivadas del proceso aterogénico. Estos reportes en conjunto con los resultados obtenidos con antelación en el grupo mediante el desarrollo de diferentes tesis de maestría y doctorado (ver Introducción) se convierten en el soporte científico para la promoción del desarrollo de productos de valor a partir de *G. madruno*.

2.4 INGREDIENTES DE VALOR DERIVADOS DE PRODUCTOS NATURALES DE ORIGEN VEGETAL

En la actualidad diversos productos naturales de origen vegetal son ingredientes constitutivos de formulaciones de productos alimentarios, suplementos dietarios, medicamentos, cosméticos, fitoterapéuticos, entre otros [144]. Su inclusión puede realizarse ya sea como materia prima cruda resultante del proceso de secado y molienda o como sub productos obtenidos tras la ejecución de procesos de extracción, fraccionamiento y/o purificación del material vegetal, dando lugar a la obtención y posterior utilización, ya sea de compuestos aislados, fracciones o extractos estandarizados. El rol que ejerce la inclusión de ingredientes obtenidos a partir de productos naturales en los productos expuestos, es ampliamente diverso, abarcando: i) funciones constitutivas de la formulación, como agentes emulsificantes, dispersantes, viscosantes, diluyentes, colorantes, conservantes, antioxidantes entre otros; y ii) funciones como bioactivo, responsable principalmente por el efecto funcional de los productos desarrollados.

En cuanto a la disponibilidad del recurso, las fuentes actuales y potenciales de origen vegetal precursoras de ingredientes naturales son ampliamente diversas. En forma resumida estas fuentes podrían categorizarse en tres grupos principales: i) los productos alimentarios cultivados tales como frutas, hortalizas, semillas, granos, cereales, etc.; ii) los productos de desecho a nivel agroindustrial obtenidos como resultados de procesos de cosecha, post cosecha y transformación industrial; y iii) el aprovechamiento de la biodiversidad de especies menos difundidas o desconocidas en torno a su química y aplicabilidad, y por ende, carentes de desarrollo agroindustrial. De igual forma, si la disponibilidad y diversidad del recurso de partida se encuentra asegurada, la diversidad en las moléculas, fracciones y extractos precursores de ingredientes aplicables a la industria, son igualmente innumerables. Siendo objeto de estudio y aprovechamiento los metabolitos primarios en sus formas moméricas, oligoméricas y poliméricas, los nutrientes y vitaminas, así como los diferentes grupos de metabolitos secundarios.

A nivel de los metabolitos primarios, los carbohidratos son ampliamente utilizados. Por ejemplo, en la industria alimentaria, las fibras solubles en agua, los polisacáridos y oligosacáridos no digeribles como la inulina, y los fructooligosacáridos y galactooligosacáridos son ampliamente valorizados como constituyentes de alimentos funcionales por sus efectos prebióticos y en la regulación de procesos hiperglicémicos [145–147]. Adicionalmente su inclusión en alimentos está relacionada también con el mejoramiento de ciertas características, como la hidratación, viscosidad, textura, propiedades sensoriales y tiempo de vida. Algunas de estas propiedades han promovido el uso de estos compuestos como una alternativa viable, funcional y valorizada para el

reemplazo de grasas de origen animal en ciertas formulaciones alimentarias [145,146]. Otra alternativa ampliamente utilizada para el reemplazo de grasas de origen animal es la utilización de aceites vegetales con propiedades fisicoquímicas similares pero con una composición química diferente. De esta forma se logra mejorar el perfil lipídico del alimento disminuyendo los ácidos grasos saturados y el colesterol, y aumentando los ácidos grasos poliinsaturados [148]. Por otro lado los polisacáridos y proteínas representan una alternativa viable para el reemplazo de surfactantes sintéticos en formas farmacéuticas y cosméticas líquidas y semisólidas [149].

Frente a los metabolitos secundarios y las vitaminas el panorama es igualmente diverso y atractivo. Los compuestos más empleados como ingredientes en la industria farmacéutica, fitofarmacéutica, cosmética y alimentaria son la vitamina C, los ácidos orgánicos, los tocoferoles, los carotenoides y los compuestos fenólicos [150]. A nivel económico, el consumo global de vitamina C en 2007, por ejemplo, alcanzó las 154 mil toneladas, destinándose aproximadamente un 50 % como aditivo alimentario, el cual normalmente es adicionado durante los procesos productivos con el fin de evitar y prevenir la despigmentación, el pardeamiento enzimático, la pérdida de sabor y aroma; proteger o aumentar el contenido de nutrientes; y aumentar el tiempo de vida del producto. Un 30 % restante es utilizado en la industria farmacéutica tanto en aplicaciones farmacéuticas como en el desarrollo de suplementos vitamínicos. El porcentaje restante es utilizado en el desarrollo de productos para la alimentación animal (13%) y en la industria cosmética (5%) [151]. En cuanto a la vitamina E el consumo para el de 2012 fue de 10.3 mil toneladas, estimándose un crecimiento del 7.3 % para 2020 con un total de 18.1 mil toneladas [152]. Finalmente el mercado mundial de los polifenoles no dista de la significancia y relevancia con respecto al de las vitaminas. De hecho en 2013, la demanda total fue de alrededor de 14.1 mil toneladas y se espera que para 2020 alcancen las 25 mil, lo que representaría un crecimiento cercano al 8.7% [153]. La importancia actual y el crecimiento futuro del mercado de los polifenoles está principalmente relacionado con las propiedades benéficas para la salud asociadas con el consumo prolongado de estos compuestos (ver numeral: 2.2).

Sin importar el papel que los ingredientes de origen natural desempeñen, normalmente el uso de productos asociados con ingredientes naturales está relacionado con los conceptos de “inocuidad”, “funcionalidad” y “química verde”. Conceptos altamente valorizados en la economía mundial actual. Se estima que solo en Norteamérica, el mercado de productos derivados de ingredientes de origen vegetal incluidos como suplementos dietarios, alimentos funcionales o productos cosméticos alcanza los 9.0, 8.6 y 5.0 billones de dólares por año, respectivamente [154]. Por lo tanto, la creciente demanda de ingredientes naturales, en conjunto con la polivalencia de estos en las diferentes industrias, han llevado al fortalecimiento de la normatividad vigente en procura de la verificación de la seguridad y eficacia de los ingredientes de origen natural. Hoy por hoy, denominaciones como:

ingrediente GRAS de sus siglas en inglés (generally recognized as safe); ingredientes FD&C de sus siglas en inglés (food, drugs and cosmetics), el concepto de alimentos funcionales y de cosmeceúticos, están soportados mediante evidencia científica de alta calidad y avalados por los principales entes reguladores de Europa y Norte América (FDA, EMA, EFSA, entre otros). De hecho se estipula que el crecimiento en la última década en el mercado de ingredientes a partir de productos naturales se debe básicamente al aumento de la demanda y a los cambios regulatorios que permiten su comercialización y avalan de cierta su forma su aplicabilidad [154]. Por lo tanto, estamos frente a un mercado diverso, versátil, con una alta demanda, regulado, en crecimiento y con grandes oportunidades para la investigación, innovación y desarrollo de ingredientes y productos de valor derivados de productos naturales de origen vegetal.

2.4.1 Tecnologías de extracción limpia para la obtención de ingredientes de valor

El gran reto a nivel de la explotación de las fuentes naturales es aumentar en términos sociales y económicos el nivel de vida de la población sin un incremento en la explotación del recurso por encima de los niveles sostenibles. Por lo tanto, el concepto de sostenibilidad o desarrollo sostenible de un proceso se consolida en la integración de tres pilares principales: el beneficio económico, social y ambiental [155]. Desde un punto de vista de la sostenibilidad, los métodos tradicionales de extracción se caracterizan por ser tiempo dependientes, poco eficientes, inespecíficos y demandantes de un alto consumo de solventes orgánicos. Por ello la utilización de tecnologías de extracción limpia buscan fomentar el uso de tecnologías emergentes y el uso de técnicas de separación de alta eficiencia [144]. La implementación de estas tecnologías confiere un desarrollo a nivel sostenible [155], ya que: 1) aporta de manera positiva al ciclo de vida a nivel ambiental, disminuyendo principalmente la generación de residuos de solventes orgánicos; 2) a nivel económico, estas tecnologías se caracterizan por ser costo - efectivas, debido a una disminución en el costo de adquisición y disposición de solventes orgánicos y un aumento de la eficiencia del proceso, por consiguiente de la productividad; 3) aporta a la integración Eco-Económica mejorando la calidad de producto y el rendimiento de proceso utilizando de manera eficiente los recursos ambientales y la energía, y 4) aporta a la integración socio-ambiental al cumplir con regulaciones de seguridad de productos alimentarios, fitoterapéuticos, nutracéuticos y cosméticos. Entre las múltiples tecnologías emergentes que presentan potenciales ventajas, se destacan la extracción asistida por ultrasonido, la extracción por fluidos supercríticos, la extracción asistida por microondas y la extracción con líquidos presurizados [144].

2.5 ESTUDIOS FARMACOCINÉTICOS Y DE BIODISPONIBILIDAD: IMPORTANCIA EN EL ESTUDIO DE EFICACIA DE PRODUCTOS NATURALES.

Anteriormente la biodisponibilidad y los aspectos farmacocinéticos relacionados con la administración de xenobioticos estaban asociados exclusivamente al estudio y desarrollo de medicamentos. Hoy en día, estos conceptos han trascendido totalmente y su importancia impacta en áreas de la salud humana, como lo son la alimentación y la nutrición, a través del conocimiento principalmente de la biodisponibilidad de nutrientes y compuestos bioactivos presentes en alimentos y productos vegetales [156]. A nivel farmacológico y de acuerdo a lo estipulado por la FDA, la biodisponibilidad está definida como: “la velocidad y cantidad, en la cual un principio activo es absorbido, siendo disponible en el sitio en donde ejercerá su respectiva acción farmacológica”[157]. Este concepto ha evolucionado con el tiempo en diferentes ocasiones, en procura de ser más incluyente. Entre las definiciones propuestas, una de las más aceptadas define a la biodisponibilidad como “la fracción de un nutriente, compuesto bioactivo o principio activo ingerido que alcanza la circulación sistémica y los sitios específicos en donde ejercerá su función o efecto biológico” [156]. No obstante, independiente del concepto de biodisponibilidad empleado, este abarca dos aspectos fundamentales: i) un conocimiento farmacocinético de los compuestos evaluados conforme a los procesos LADME (liberación, absorción, distribución, metabolismo y excreción); y ii) una relación inherente entre la bioeficacia de una sustancia y la biodisponibilidad de esta, siendo esta última uno de los parámetros más relevantes a la hora de evaluar y atribuir efectos biológicos a nivel *in vivo* empleando rutas de administración extravasculares [158].

La importancia del conocimiento de la biodisponibilidad de compuestos bioactivos procedentes de alimentos y matrices vegetales, tiene sus inicios a mediados de los años 90 debido a la relación atribuida entre el consumo regular de ciertos alimentos y la disminución en la incidencia de algunas enfermedades de tipo crónico no transmisible. Entre los grupos fitoquímicos que empezaron a cobrar un mayor interés figuraban los compuestos fenólicos, a los que se les consideró como uno de los grupos responsables de estos efectos [159–161]. Con el paso de los años, las actividades atribuidas a los compuestos fenólicos son innumerables, las cuales han sido determinadas a través de una batería de ensayos *in vitro* y empleando modelos animales específicos. Como resultado, adicional al efecto antioxidante, con este grupo de compuestos se han descrito efectos sobre la proliferación celular, la captación y regulación del colesterol, la modulación de diferentes enzimas incluyendo: telomerasas, ciclooxigenasas, lipoxigenasas, entre otras. Adicionalmente estos compuestos se han relacionado con modular e interactuar con diferentes rutas de señalización, intervenir en la regulación celular y en el funcionamiento plaquetario y hasta se ha demostrado su capacidad de prevenir la disfunción endotelial

[156]. Sin embargo, independiente del efecto biológico que presenten a nivel *in vivo* tras una ingesta por vía oral, desde una estabilización de un radical libre hasta la modulación de rutas de señalización, el efecto siempre dependerá de la presencia de las moléculas activas circundante en el blanco farmacológico a una concentración indicada, en el tiempo indicado y en el lugar indicado; es decir, de la biodisponibilidad de los compuestos.

Frente a este aspecto, los compuestos fenólicos han estado inmiscuidos en medio de una gran paradoja. Por un lado, estudios epidemiológicos atribuyen efectos benéficos con el consumo regular de estos compuestos [90]. Por otro lado, los estudios clínicos son variables en algunos casos mostrando resultados efectivos en otros no tanto y a su vez a gran parte de los compuestos fenólicos se les ha encontrado baja biodisponibilidad, alcanzando concentraciones subterapéuticas a nivel sistémico con respecto a los compuestos de origen administrados [156]. Por tal motivo, en la evaluación y validación de la eficacia de este tipo de compuestos, la evaluación conjunta de la biodisponibilidad y el conocimiento farmacocinético es requerido en procura de determinar las concentraciones alcanzadas a nivel sistémico, los metabolitos formados y así poder establecer conclusiones pertinentes conforme a los mecanismos de acción y al o las moléculas involucradas en la bioactividad [156,158,162].

Para contextualizar los procesos que influyen en la biodisponibilidad, de forma general, un fármaco, compuesto fenólico y en general cualquier xenobiotico ingerido o administrado por vía oral alcanza su lugar de acción a nivel sistémico y es biodisponible, cuando haya superado ciertas barreras biológicas y fisicoquímicas (Figura 9). En principio debe haberse disuelto en los fluidos del lumen intestinal, seguido de un proceso de absorción en el tracto gastro intestinal (TGI), una disminución de la concentración a causa del metabolismo presistémico y sistémico, un proceso de distribución en proteínas y tejidos periféricos y finalmente sufrir una eliminación del compuesto y sus metabolitos por vía renal o fecal, principalmente. Así el primer proceso influyente en la biodisponibilidad de un compuesto será la disolución de este en los fluidos del TGI. En los fármacos este proceso se denomina liberación (L) y hace parte del proceso LADME. Por su parte, para los compuestos fenólicos, nutrientes y compuestos bioactivos en general derivados de alimentos y productos vegetales, este proceso se denomina como bioaccesibilidad [163], Así la bioaccesibilidad se constituye como uno de los factores predominantes en la biodisponibilidad, dada la dificultad existente en la liberación y subsecuente solubilización de los compuestos bioactivos tras la ingesta de matrices mucho más complejas que las empleadas en los medicamentos. Como ejemplo, se estima que del consumo total de polifenoles de la dieta, cerca del 48 % de estos son bioaccesibles a nivel del intestino delgado y 42 % en el intestino grueso, existiendo una variabilidad significativa en los resultados encontrados conforme al tipo de compuesto y a la matriz alimentaria de partida [163].

A nivel de los procesos de absorción, metabolismo, distribución y eliminación de compuestos fenólicos y en especial de flavonoides y ácidos clorogénicos, son diversos los estudios que se han realizado contribuyendo cada vez más con el conocimiento de estos parámetros en procura de establecer relaciones más coherentes en términos de la biodisponibilidad y la bioeficacia. Anteriormente, los efectos en la salud y las propiedades benéficas atribuidas a estos compuestos estaban directamente relacionadas con el consumo de los respectivos glicósidos y agliconas provenientes de la fuente natural [158]. Hoy en día los resultados de estudios de biodisponibilidad, en conjunto con el establecimiento de modelos *in vitro* e *in vivo*, promueven a los metabolitos de los compuestos fenólicos como las entidades biodisponibles que alcanzan las mayores concentraciones plasmáticas, la difusión en tejidos y células, presentando en muchos de los casos, perfiles de actividad diferentes a los compuestos de partida estableciéndose de esta forma como las posibles moléculas responsables de la actividad *in vivo* [158,162,164–166].

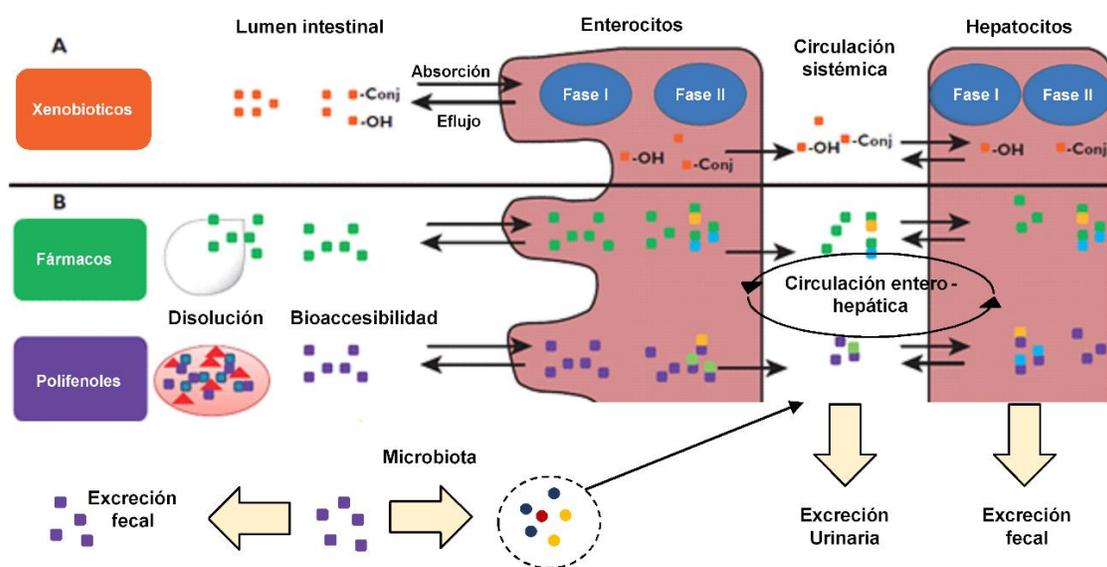


Figura 9. Esquema general de absorción, metabolismo y excreción de xenobioticos, fármacos y compuestos fenólicos. Modificado de [158]

La cantidad y el tipo de derivados fenólicos encontrados en plasma tras la ingesta de una fuente representativa de compuestos fenólicos, dependen principalmente de las modificaciones y reacciones que den lugar durante los procesos de absorción y metabolismo presistémico que se presentan durante el tránsito de los compuestos de partida por las diferentes partes del TGI. De forma general, la absorción y metabolismo de compuestos fenólicos a través del TGI se caracteriza por: i) reacciones de hidrólisis durante

todo el trayecto, ii) absorción de agliconas en el estómago e intestino delgado a través de difusión pasiva y por medio de transportadores específicos, iii) reacciones metabólicas presistémicas predominantes de fase II en enterocitos y iv) catabolismo regulado por la microbiota intestinal con la posterior absorción de los metabolitos formados en el intestino grueso (Figura 9).

De forma secuencial, en la cavidad bucal los glicósidos de los compuestos fenólicos pueden ser modificados debido a la actividad hidrolizante de la saliva, y las agliconas pueden reaccionar con proteínas ricas en prolina promoviendo la agregación y la subsecuente precipitación de estos complejos [162,167]. En el estómago, diversos polifenoles (Ej. resveratrol, quercetina y catequina [168,169]) pueden ser estables bajo las condiciones ácidas presentadas, sin embargo, para el caso de las procianidinas, estudios *in vitro* sugieren una ruptura de los enlaces interflavonoides bajo condiciones simuladas similares a las del estómago humano [170]. Mientras tanto estudios *in vivo* demuestran lo contrario, afirmando que las procianidinas con hasta un grado de polimerización de 5, alcanzan el intestino delgado de forma inalterada [171]. A nivel de la absorción, son diversos los reportes que confirman que compuestos como: ácidos fenólicos, agliconas de flavonoides y principalmente antocianinas son absorbidos a nivel estomacal [172–174]. De estas últimas existen reportes, encontrando niveles significativos de malvidin-3-glucosido en plasma de ratas 6 minutos después de la administración [174]. La gran velocidad de absorción encontrada en estos compuestos estaría relacionada con la utilización de la bilitranslocasa, un transportador de membrana presentes en el epitelio gástrico destinado para el transporte de aniones orgánicos como la bilirrubina y biliverdina [172].

Por otra parte en la naturaleza la mayor parte de los flavonoides se encuentran en formas glicosidadas, por tanto la administración o ingesta de estas formas deparan mecanismo especiales para su absorción ya que el tamaño y polaridad de estos glicósidos imposibilita su difusión a través de la membrana epitelial. A nivel del intestino delgado existen dos mecanismos enzimáticos principales, la lactasa (LPH, de sus siglas en inglés lactase-phlorizin hydrolase) y la β -glucosidasa citosólica (CBG) [162,164,175]. La primera se encuentra en el lado luminal del borde en cepillo del intestino delgado y es la enzima responsable de la hidrólisis de lactosa en glucosa y galactosa. Bajo este mecanismo se ha reportado la hidrólisis de flavonoides-O- β -D-glucósidos, liberando de esta forma, sus respectivas agliconas, capaces de difundir por la membrana epitelial. Como mecanismo hidrolítico alternativo se encuentra el mediado por la GBC. Para este caso se propone que el transportador de glucosa sodio dependiente (SGLT-1) está involucrado en el transporte de los glicósidos de flavonoides desde el lumen intestinal hasta el interior de las células epiteliales, una vez al interior de la célula por acción de la GBC el glicósido de flavonoide es rápidamente transformado en su respectiva aglicona y está en conjunto con las demás

agliconas absorbidas comienzan el proceso de biotransformación presistémica a nivel de los enterocitos (Figura 10).

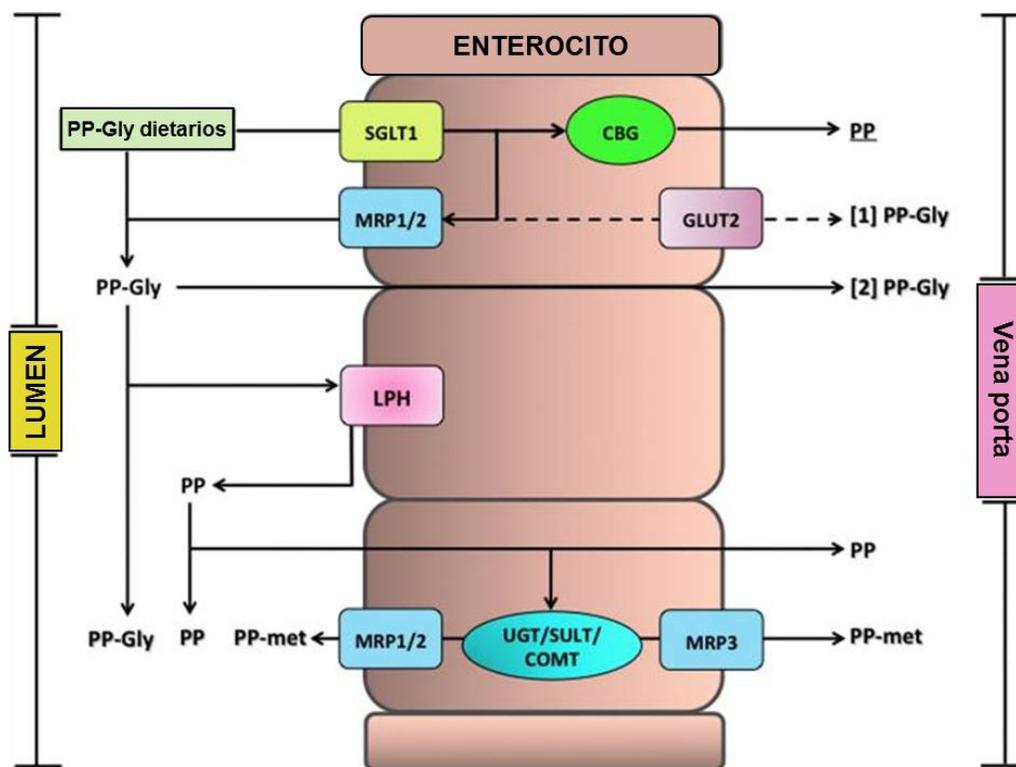


Figura 10. Mecanismo de absorción y metabolismo presistémico de flavonoides y compuestos fenólicos. PP: polifenol, PP-Gly: glicósido; PP-met: metabolito del compuesto fenólico. Modificado de [176]

A diferencia de la mayor parte de los fármacos, los compuestos fenólicos se caracterizan por presentar un alto metabolismo presistémico con prevalencia por las reacciones de fase II. Las principales reacciones metabólicas que se dan lugar al interior de los enterocitos están catalizadas por las UDP-glucuronosiltransferasas (UGT), sulfotransferasas (SULT) y catecol-O-metiltransferasas (COMT), dando lugar a derivados glucoronidados, sulfatados y metilados, respectivamente, así como posibles combinaciones de estos (Figura 10) [176]. Adicionalmente en la membrana apical de los enterocitos pueden existir procesos de eflujo, promoviendo así el paso de los metabolitos y las agliconas absorbidas desde el interior del enterocito al lumen intestinal. Este proceso es mediado por transportadores de la familia ABC (ATP-Binding-Cassette), siendo los más representativos los transportadores MRPs (Multidrug Resistance Proteins), los BCRP (breast cancer resistance protein) y la glicoproteína-P [177]. Continuando con el proceso metabólico de los compuestos fenólicos, las agliconas absorbidas y los metabolitos formados son transportados desde el interior de los enterocitos al hígado a través de la vena porta. Allí al igual que la mayor parte de

xenobioticos y fármacos, los compuestos fenólicos son biotransformados nuevamente mediante reacciones de fase I y II. A nivel de los procesos de conjugación (reacciones de fase II), en el hígado predominan la metilación y sulfatación por encima de la glucuronidación. Si bien existen reportes de metabolitos de flavonoides obtenidos por reacciones de fase I mediadas por alguna isoenzima del complejo CYP 450 [178], la relevancia de los productos obtenidos por este mecanismo no se compara con el contenido de metabolitos formados por conjugación [179].

Una vez transcurrido el paso por el intestino delgado, las agliconas, glicósidos y metabolitos no absorbidos se ponen en contacto con la microflora presente en el intestino grueso. Las bacterias intestinales tienen la capacidad de hidrolizar glicósidos, glucurónidos, sulfatos, amidas, ésteres y lactonas; inclusive tienen la habilidad de producir rupturas a nivel de fisión de anillos de flavonoides y procianidinas y mediar procesos de reducción, descarboxilación, desmetilación y dehidroxilación [162]. Bajo este complejo panorama metabólico, los productos catabólicos obtenidos por las reacciones mediadas por la microflora son diversos y se caracterizan por ser productos de bajo peso molecular. Adicionalmente existen evidencias suficientes que demuestran que estos catabolitos son absorbidos en el intestino grueso, posteriormente metabolizados por reacciones de conjugación en el intestino e hígado y eliminados por vía renal finalmente [156,158,162,164,176,180,181]. A nivel comparativo, en la orina, en proporción son más los metabolitos colónicos encontrados que las propias agliconas y metabolitos conjugados de estas. De hecho en estudios recientes en humanos, se encontraron más de 138 metabolitos diferentes en orina derivados del consumo de flavanoles del té. De los cuales la mayor parte correspondía a metabolitos colónicos producto de la fisión del anillo de estos flavonoides y en donde la biodisponibilidad encontrada producto del monitoreo de estos metabolitos alcanzó valores promedio de hasta un 63%, siendo los metabolitos colónicos las especies más abundantes [180,181].

Bajo este panorama el monitoreo y la evaluación de la biodisponibilidad de compuestos fenólicos es una actividad compleja, que hoy por hoy requiere un conocimiento metabólico significativo y que debe estar respaldada por procesos analíticos sensibles, selectivos y que brinden información estructural significativa.

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GENERAL

Determinar los principales parámetros farmacocinéticos de los biflavonoides presentes en un extracto estandarizado de *G. madruno* obtenido en términos del contenido de biflavonoides y su actividad antioxidante.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Desarrollar métodos analíticos mediante HPLC/DAD/MS para la identificación y cuantificación de biflavonoides en extractos obtenidos a partir de *G. madruno* y en matrices biológicas

Estandarizar químicamente un extracto de biflavonoides, obtenido mediante extracción líquida a partir de *G. madruno* en términos de su rendimiento, compuestos bioactivos y capacidad antioxidante, que sirva como precursor de un ingrediente funcional.

Evaluar la actividad antioxidante y el mecanismo predominante de los principales biflavonoides de *G. madruno* mediante un estudio de relación estructura-actividad antioxidante en relación con los flavonoides estructuralmente relacionados.

Determinar los principales parámetros farmacocinéticos de los biflavonoides de *G. madruno*, mediante el seguimiento de la concentración plasmática en el tiempo.

4 EVALUACIÓN CUALITATIVA Y CUANTITATIVA DE BIFLAVONOIDES DE *GARCINIA MADRUNO*

4.1 MATERIALES Y MÉTODOS

4.1.1 Material vegetal

Para este estudio fueron utilizadas las partes aéreas de la especie *Garcinia madruno* (Kunth) Hammel. La recolección de las muestras se ejecutó a final del mes de enero del año 2014 a partir de dos árboles hembra localizados dentro del campus principal de la Universidad de Antioquia. Este proceso conto con la asesoría del botánico Fernando Alzate y se basó en los muestreos previos ejecutados en los trabajos anteriores. El muestreo se realizó en 6 partes diferentes de cada árbol con el objetivo de cubrir la mayor área superficial posible. Como producto del muestreo se obtuvieron hojas, tallos, y frutos de *G. madruno* (Figura 7). La muestra total se seleccionó conforme a su aspecto, y aquel material en buen estado se agrupó en tres grupos diferentes: hojas, tallos (se utilizaron tallos con diámetros menor a 2 cm) y frutos. A su vez los frutos fueron disgregados obteniéndose tres matrices independientes: epicarpio, mesocarpio y semillas. De esta forma, se obtuvieron 5 matrices diferentes de *G. madruno*: 1) Hojas; 2) Tallos, 3) Epicarpio, 4) Mesocarpio y 5) Semillas. Adicionalmente, cada matriz obtenida se lavó con abundante agua y jabón. Las matrices 1 y 2 fueron picadas de forma manual y secadas a 40°C por 5 días en un horno de secado de aire circulante. Las matrices 3 y 5 fueron congeladas en nitrógeno líquido y secadas por liofilización. La matriz 4 fue licuada en agua destilada y el jugo procedente fue secado por liofilización. Una vez todas las matrices estuvieron secas fueron molidas y el producto resultante fue almacenado a 4° C protegido de la luz y la humedad, hasta ser utilizados en los posteriores análisis.

4.1.2 Material de referencia empleado

La Am fue adquirida como estándar primario de la marca TCI chemical con una pureza cromatográfica mayor al 98%. Debido a que no fue posible conseguir estándares comerciales de los biflavonoides restantes, los compuestos Mo, Vo y Fu fueron aislados y purificados a partir de una fracción biflavonoide proporcionada por el Grupo de Investigación en Sustancias Bioactivas [42]. Para esto se emplearon métodos cromatográficos basados en cromatografía planar (TLC) y cromatografía planar de alta eficiencia (HPTLC). Como metodología general: 10 mg de fracción fueron pesados y diluidos en 200 µL de metanol. La solución obtenida fue sembrada en una placa de sílice con soporte de vidrio (20x20 cm, 0.25 mm de grosor) utilizando el módulo de siembra del HPTLC (CAMAG - LINOMAT 5).

Una vez sembrada la placa, esta se eluyó en una cámara de elución, empleando un sistema previamente optimizado compuesto por cloroformo/acetona/ácido fórmico en una proporción 80:13:7. Terminada la elución de la placa, los compuestos de interés fueron raspados en los RF respectivos y la silica resultante se sumergida en una mezcla de metanol/acetona, sonicada y posteriormente filtrada a través de filtros de membrana de 0.45 micras. El filtrado obtenido fue concentrado a sequedad a presión reducida a una temperatura de 38°C usando un Centrivap (Labconco). Finalmente las moléculas obtenidas fueron analizadas por HPLC-DAD para determinar su pureza y por HPLC-MS cuadrupolo simple para confirmar su identidad, obteniendo en todos los casos purezas mayores al 97% de cada uno de los biflavonoides.

4.1.3 Preparación de muestras

4.1.3.1 Extractos no hidrolizados

El procedimiento general empleado para el tratamiento de las muestras de las diferentes matrices de *G. madruno*, con fines cualitativos y cuantitativos, se realizó conforme a la metodología optimizada desarrollada en este trabajo. Brevemente, cada muestra se pesó (100 mg) y se extrajo con 1.3 mL de solución de extracción (etanol / agua 74:26) durante 58 minutos en un baño ultrasónico a 30°C con una frecuencia de 37 KHz. Una vez terminado el proceso de extracción, el extracto se centrifugo a 13.000 RPM por 10 minutos a 4°C. El sobrenadante resultante se transfirió a un balón volumétrico de 2.0 mL. El precipitado se lavó con 500 µL de solución de extracción y nuevamente se centrifugó bajo las condiciones ya descritas. El sobrenadante obtenido del lavado se transfirió al mismo balón volumétrico y se aforo con solución extractora. El extracto final resultante fue rotulado y almacenado a -20°C hasta su posterior análisis. Previamente al análisis cuantitativo o cualitativo por HPLC DAD-MS, cada muestra se diluyo en fase móvil en una proporción adecuada de acuerdo al tipo de análisis requerido y fue filtrada a través de una membrana de nylon de 0.45 µm.

4.1.3.2 Extractos hidrolizados

Para el análisis cualitativo y cuantitativo de las agliconas y glicósidos de biflavonoides presentes en las diferentes matrices de *G. madruno*, 100 µL de cada extracto obtenido mediante la metodología descrita en el numeral anterior, fueron hidrolizados agregando 100 µL de ácido sulfúrico al 97 % y 300 µL de solución extractora. La mezcla de reacción se sonicó por 60 minutos a una temperatura de 60°C. El producto resultante fue centrifugado y el sobrenadante obtenido fue filtrado y almacenado hasta los posteriores análisis por HPLC-DAD-MS.

4.1.4 Análisis de biflavonoides de *G. madruno* por HPLC-DAD-MS

El análisis cromatográfico por HPLC se llevó a cabo en un equipo Agilent series 1200 (Agilent Technologies, Palo Alto, CA, EE.UU.), equipado con un desgasificador de vacío, un automuestreador automático, una bomba cuaternaria y un detector de arreglo de diodos (DAD). La separación de los compuestos se realizó usando una columna Zorbax SB RRTH (de rápida resolución y alto rendimiento) ® C18 (50mm x 4.6mm con 1.8µm de tamaño de partícula), con un flujo de 1.0 mL/min y a una temperatura del horno de la columna de 35°C. Una vez optimizada la metodología de separación, la fase móvil consistió en agua al 0.1% de ácido acético (A) y acetonitrilo (B), y el gradiente lineal utilizado fue el siguiente: 0 min, 22.5% B; 3.5 min, 22.5% B; 12 min, 50% B; 14 min, 90% B; 18 min, 90% B; 20 min, 22.5% B; 21 min 22.5% B. El volumen de inyección fue de 3 µL. Los compuestos analizados fueron monitoreados en el DAD a 290 y 335 nm y los espectros se registraron entre 200 y 400 nm.

Con el objetivo de identificar, evaluar la pureza y confirmar la presencia de los biflavonoides obtenidos en extractos hidrolizados, no hidrolizados y en los productos de purificación, se desarrolló un método por LC-MS empleando un cromatografo Agilent 1200 LC-DAD-MSD-Q (Agilent Technologies, Palo Alto, CA, USA) equipado con una fuente de ionización por electrospray (ESI) y una detección simultanea por DAD. La ionización de los diferentes biflavonoides se optimizó mediante un análisis por inyección de flujo (de sus siglas en inglés FIA (Flow Injection Analysis)). De forma general, la ionización se llevó a cabo empleando la fuente ESI en modo negativo en conjunto con los siguientes parámetros: gas de sacado (N₂): 5 L/min; presión del nebulizados: 60 psig; temperatura del gas de secado: 350°C; temperatura del vaporizador: 400°C; voltaje del capilar: 2.7 kV; voltaje del fragmentor en modo SCAN: 150 V; y voltaje del fragmentor modo SIM: variable, correspondiente a: 130, 130, 170 y 200 V para Mo, Vo, Fu, y Am, respectivamente. La detección e identificación de los biflavonoides se realizó empleando el modo SCAN en rango de adquisición de 500 a 800 *m/z*, y de forma selectiva mediante el monitoreo de los respectivos iones moleculares [M-H]⁻ (modo SIM) de los compuestos: Mo (*m/z* 555), Vo (*m/z* 539), Am (*m/z* 537), Fu (*m/z* 717) y Es (*m/z* 701).

4.1.4.1 Cuantificación de biflavonoides de *G. madruno*

Para la cuantificación de los biflavonoides (Mo, Vo, Am y Fu) en las muestras de análisis (extractos hidrolizados, no hidrolizados, y extractos optimizados), se empleó el método de calibración del estándar externo. A partir de tres soluciones de trabajo de un mix de 500 µg/mL de cada uno de los biflavonoides preparados en metanol, se prepararon tres curvas de calibración en distintos días, cada una con un mínimo de 6 niveles de calibración y 3 réplicas por cada nivel. La curva definitiva se construyó con $K \geq 6$ y $n = 3$, en donde el valor de una de las réplicas en un nivel determinado, corresponde al valor resultante del promedio

de las tres réplicas de dicho nivel de una de las tres curvas realizadas. La cuantificación de cada biflavonoides se realizó por interpolación de la respuesta (área) en la ecuación de la recta construida mediante el modelo de regresión lineal tomando como respuesta (y) el área de cada pico y (x) la concentración nominal en cada nivel evaluado. Finalmente, el contenido de Mo, Fu, Vo y Am se expresó como miligramo de compuesto por gramo de muestra o extracto seco (mg BF/g de muestra/extracto) acorde al siguiente modelo de cálculo.

$$\frac{\text{mg BF}}{\text{g muestra}} = \frac{\frac{\text{mg}}{\text{L}} (\text{de la curva}) \times \text{FD} \times V (\text{L})}{\text{masa de muestra (g)}} \times \frac{1 \text{ g}}{1000 \text{ mg}} \quad (\text{Ecuación 1})$$

4.1.4.2 Validación del método analítico

La validación de la metodología se realizó conforme a lo estipulado en las guías internacionales [182], los libros de validación de entidades farmacéuticas y afines [183–185], y acorde al procedimiento interno de validación del GISB (P-GISB-A002, versión 01: Validación de métodos analíticos). Este último es un compendio de las guías y libros referenciados, ajustado a las necesidades específicas del laboratorio y soportado por el sistema de gestión de la calidad del grupo conforme a los requerimientos de la norma NTC ISO/IEC 17025:2005. Los parámetros incluidos en la validación fueron los siguientes: selectividad, linealidad y rango, límite de cuantificación (LOQ) y límite de cuantificación práctico (LLOQ), variabilidad intra-día (repetibilidad), variabilidad inter-día (precisión intermedia), y exactitud evaluada a través de la veracidad y el sesgo del método.

La **selectividad** se determinó en cada uno de los picos de interés mediante la evaluación de: i) la forma y pureza cromatográfica de los picos contrastados entre los estándares de referencia y las muestras de análisis; ii) los principales parámetros cromatográficos que aseguran una separación adecuada con fines cuantitativos (resolución (R_c), selectividad (α_c), y factor de retención (k)); y iii) mediante la evaluación del espectro de masas obtenido por LC-MS, de los estándares y muestras de análisis.

La **linealidad** se evaluó sobre la curva de calibración obtenida a partir de las tres curvas independientes. Como parámetros de linealidad se evaluaron el coeficiente de correlación (r), el coeficiente de determinación (r^2) y la homogeneidad de varianza (homocedasticidad) determinada mediante un test de Cochran (Ecuación 2). Por su parte, el **rango dinámico** se determinó como el intervalo de concentraciones en el cual se garantiza una cuantificación adecuada cumpliendo con los parámetros de precisión y exactitud en cada nivel, pero ajustado a las necesidades de cada análisis conforme al contenido presente en cada matriz.

$$G_{Exp} = \frac{S_{m\acute{a}xima}^2}{\sum S_i^2} \quad (\text{Ecuaci3n 2})$$

Donde:

S_i^2 : Varianza de cada nivel K de las respuestas normalizadas

$S_{m\acute{a}xima}^2$ = varianza m\acute{a}xima de las K niveles

G_{tablas} = ($\alpha=0.05$; con K=n\acute{u}mero de niveles y n= n\acute{u}mero de r\acute{e}plicas por nivel)

Existe homogeneidad de varianza cuando $G_{Exp} < G_{Tablas}$

El **LOQ** y **LLOQ** se calcularon experimentalmente realizando diferentes niveles de concentraci3n por debajo del punto m\acute{a}s bajo estipulado en el rango din\acute{a}mico. El LOQ se defini3 como la concentraci3n m\acute{in}ima alcanzable para cuantificar con una precisi3n y veracidad adecuada, reflejada en coeficiente de variaci3n (CV) < 10 % y un error relativo (%ER) de las respuestas autointerpoladas entre \pm un 10%, respectivamente. Por su parte el LLOQ se defini3 como el valor m\acute{in}imo de concentraci3n de la curva de calibraci3n del rango din\acute{a}mico seleccionado que cumpla con los criterios de precisi3n y exactitud.

La **precisi3n** se evalu3 bajo dos par\acute{a}metros: la precisi3n intra-d\acute{a} (repetibilidad del m\acute{e}todo) y la precisi3n inter-d\acute{a} (precisi3n intermedia). La precisi3n intra-d\acute{a} se evalu3 mediante el an\acute{a}lisis completo de 6 muestras independientes de cada matriz de *G. madruno* (hojas, tallos, epicarpio, mesocarpio y semillas) analizadas en el mismo d\acute{a}a, por el mismo analista, aplicando el procedimiento descrito de preparaci3n de muestras (numeral 4.1.3.1). Por \acute{u}ltimo, la precisi3n inter-d\acute{a} se determin3 de igual forma que la intra-d\acute{a}, con la diferencia de evaluar dos lotes de muestras de n=6 en dos d\acute{a}as distintos y por dos analistas diferentes, para un total de n=12. Para todos los tipos de precisi3n se calcul3 su respectivo CV. Como criterio de aceptaci3n se estableci3 un CV inferior al 5, 10 y 15 % para la repetibilidad instrumental, repetibilidad del m\acute{e}todo y precisi3n intermedia, respectivamente.

La **exactitud** del m\acute{e}todo se evalu3 frente a los par\acute{a}metros de veracidad y sesgo. A partir de 9 r\acute{e}plicas de est\acute{a}ndares a 3 niveles de concentraci3n diferentes (nivel bajo, medio y alto). La veracidad fue determinada mediante el %ER promedio obtenido en cada nivel, y el sesgo del m\acute{e}todo se determin3 aplicando la prueba de t-student para la evaluaci3n de la significancia estad\acute{i}stica entre el valor de referencia de los niveles evaluados y los valores experimentales promedio obtenidos (Ecuaci3n 3). Como criterio de aceptaci3n para cada nivel, se adopt3 un %ER < 10 % y un valor $t_{calculado} <$ al valor de $t_{cr\acute{i}tico}$ para la veracidad y el sesgo, respectivamente.

$$t_{cal} = \frac{[X_a - X]}{SX\sqrt{n}} \quad (\text{Ecuaci3n 3})$$

Donde:

t_{cal} = t observado o t calculado

X_a = Valor teórico (concentración)

X = Promedio de valores obtenidos (concentración)

S = Desviación estándar

n = número de lectura o replicas

$t_{critico}$: valor de la tabla correspondiente (t-student) con grados de libertad $n-1$ y un error α de 0,05.

4.2 RESULTADOS Y DISCUSIÓN.

El desarrollo de métodos analíticos cromatográficos para el análisis de metabolitos secundarios de productos naturales es uno de los pasos más representativos en el estudio de especies de origen vegetal, debido principalmente, a que su empleo puede proveer información tanto de tipo cualitativa como cuantitativa. Conforme a lo reportado para los biflavonoides de la especie *G. madruno* y del género en general, la gran mayoría de los estudios, si bien han brindado una información fitoquímica significativa, aislando y elucidando en cantidades considerables una serie de biflavonoides a los cuales se les han atribuido propiedades biológicas, los abordajes metodológicos empleados se han basado en aislamientos cromatográficos convencionales, caracterizados por ser tiempo demandantes, poco reproducibles y por no brindar un conocimiento general acerca del perfil metabólico cualitativo y cuantitativo de una especie como tal. Por lo tanto, basado en el conocimiento adquirido de los biflavonoides de *G. madruno* y sus efectos potenciales sobre el cuidado de la salud, es imperativo profundizar en la evaluación analítica de estos compuestos. Esto, con el fin de proporcionar la información pertinente en pro de postular a *G. madruno* como una especie promisoría para la explotación industrial, dado su alto contenido de biflavonoides, en la búsqueda de ingredientes de valor. De esta forma, en esta etapa se plantea desarrollar el primer método cromatográfico, para la identificación y cuantificación de biflavonoides en las diferentes matrices de *G. madruno*.

4.2.1 Desarrollo y optimización de la metodología cromatográfica

A nivel cromatográfico existen múltiples metodologías analíticas empleadas para la determinación cuantitativa de metabolitos secundarios en plantas y alimentos. Diversos tipos de cromatografía (GC, HPLC y HPTLC), modos de separación y detectores han sido empleados. Sin embargo en el análisis de polifenoles, la cromatografía líquida en fase reversa (RPLC) con columnas C8 o C18 acoplada a detectores UV y/o masas, es sin duda alguna el método más empleado a nivel mundial [186–188]. De esta forma para dar cumplimiento a este trabajo, se desarrolló un método por RPLC para la cuantificación de los biflavonoides en las diferentes matrices de *G. madruno*.

Las condiciones cromatográficas fueron optimizadas mediante un procedimiento sistemático utilizando los estándares de referencia disponibles (Mo, Fu, Am, y Vo) y las muestras objeto de análisis. En principio, con la mezcla de estándares, los eluentes de la fase móvil y la columna descrita en la metodología, se desarrolló un método isocrático que permitiera la separación de los 4 analitos de interés. Como resultado a un 40% de B se lograba una separación adecuada de todos los biflavonoides, cumpliendo con los parámetros cromatográficos: resolución (R_c)>2, selectividad (α_c)>1 y un factor de retención (k) entre 3 y 10 para cada uno de los picos. Sin embargo cuando el método isocrático fue probado con una muestra problema procedente de las hojas del madroño, claramente se observaron procesos de coelución y deformación de picos que hacían imposible un abordaje cuantitativo con esta metodología. Por lo tanto se decidió emplear un método por gradiente, conservando los dos eluentes de la fase móvil y la columna empleada. Como resultado del proceso de optimización, se muestran en la Figura 11 los cromatogramas representativos de la mezcla de los 4 biflavonoides, una muestra de hojas de *G. madruno* y el perfil cromatográfico de las 5 matrices objeto de análisis. Bajo estas condiciones, se obtuvo la separación de Fu (1), Mo (2), Vo (3) y Am (4) en un tiempo de alrededor de 10 min (Figura 11-A). Si bien, se observan picos no identificados entre los compuestos 1 y 2 (Figura 11-B y C), la metodología propuesta presenta un poder de resolución significativo para la separación de los 4 biflavonoides, proporcionando así, las condiciones adecuadas para su cuantificación, independientemente de la matriz de *G. madruno* utilizada (Figura 11-C).

De acuerdo a la literatura encontrada, no existen reportes en donde se presente la cuantificación de biflavonoides en *G. madruno*. Respecto a otras especies del género *Garcinia*, hasta el momento existe un reporte sobre la cuantificación simultanea de Fu, Mo, Vo y Am en un tiempo de 35 minutos por corrido empleando un HPLC-DAD [114]. En otros estudios donde se cuantifica Am en conjunto con otros biflavonoides, se alcanzan tiempos de hasta 50 minutos por corrido [189,190] en equipos similares. Si bien, la información existente no es abundante, el desarrollo de este método claramente representa una mejora en la separación y en la disminución del tiempo por corrido en el análisis de biflavonoides empleando equipos de cromatografía convencional. Esto se debió principalmente, al haber empleado columnas sub 2 micras de alto rendimiento y eficiencia, que a costa de una disminución del tamaño de partícula, mejoran la separación y promueven una disminución en los tiempos de análisis. El uso de columnas de sub 2 micras normalmente está asociado con el empleo de equipos de cromatografía líquida de alta presión (UHPLC). Esto se debe principalmente al aumento subsecuente de la presión, derivado de la relación inversa, entre el tamaño de partícula y la presión del sistema. De hecho, se estima que una disminución de la mitad en el tamaño de partícula, puede aumentar el doble de la eficiencia en la separación y cuadruplicar al mismo tiempo la presión [191]. En nuestro caso, a un flujo de

1 ml/min, fue suficiente aumentar la temperatura de la columna a 35°C para alcanzar valores admisibles en la presión en un HPLC convencional (menores a 300 bares).

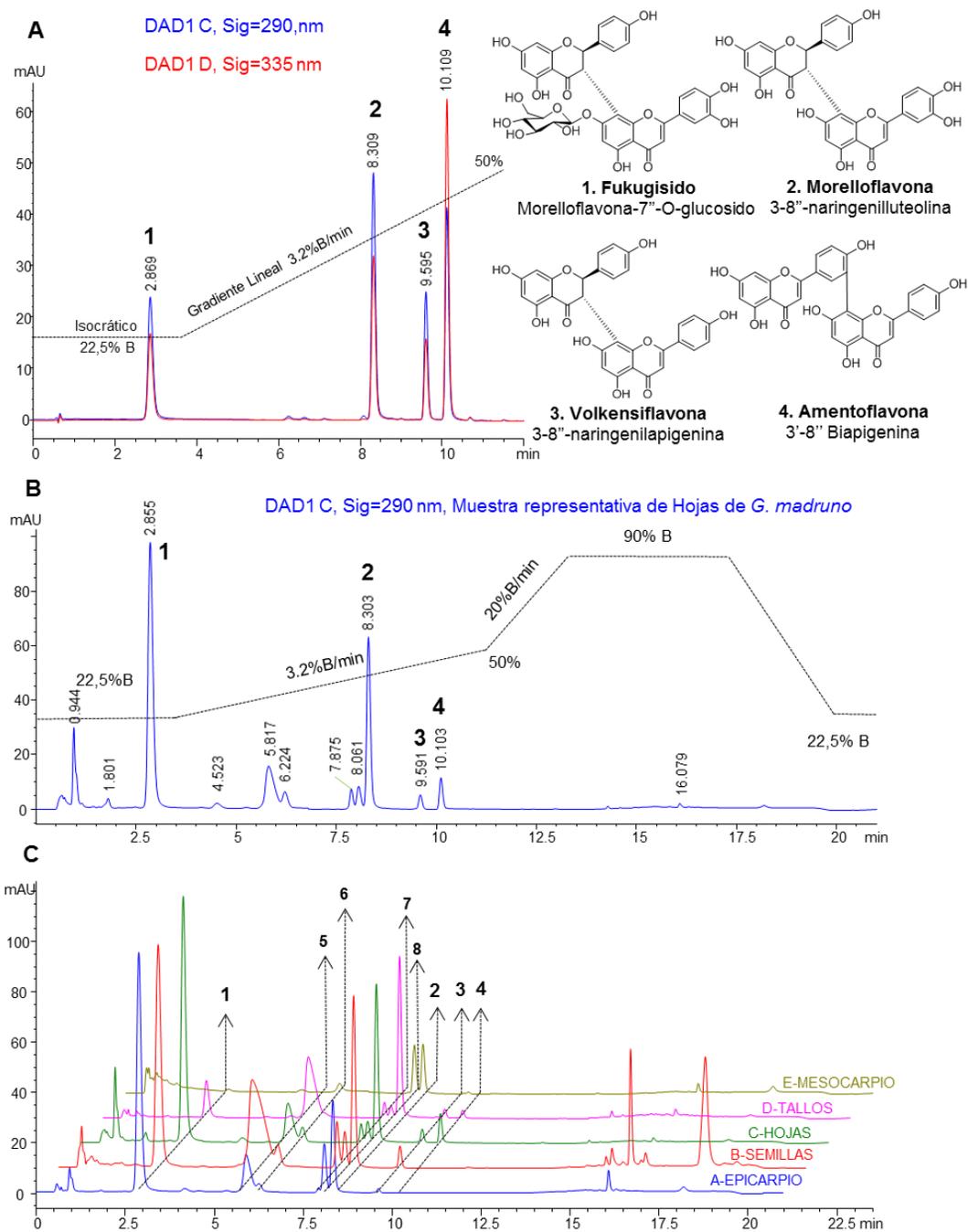


Figura 11. Separación cromatográfica de los biflavonoides de *G. madruno*. (A) mix de estándares a 25 µg/mL. (B) perfil cromatográfico de una muestra de hojas de *G. madruno*. (C) Perfil cromatográfico (UV 290nm) de las 5 matrices de *G. madruno*. Los picos 1, 2, 3 y 4 corresponden en su orden a los compuestos: Fukugisido (Fu), Morelloflavona (Mo), Volkensiflavona (Vo) y Amentoflavona (Am); los picos 5, 6, 7 y 8 son desconocidos. La cromatogramas mostrados en la

figura C no se encuentran en la misma escala y cada uno de ellos fue inyectado a diferentes diluciones

4.2.2 Identificación de biflavonoides de *G. madruno*

Al evaluar el desempeño del método cromatográfico en las diferentes matrices de *G. madruno* (Figura 11-C), fue evidente observar la existencia de una serie de picos, con respuestas significativas (área), adicionales a las determinadas para los 4 biflavonoides utilizados como estándar. Especialmente en aquellas matrices derivadas del fruto (epicarpio, mesocarpio y semillas). Los principales picos desconocidos observados en casi todas las matrices (picos 5, 6, 7 y 8), como se muestra en la Figura 11-B, aparecen en un rango de tiempo comprendido entre el tiempo de retención del Fu y la Mo. Teniendo presente reportes fitoquímicos previos [42,110]. Dos biflavonoides glicosidados derivados de Mo y Vo, Ma (compuesto 14-Figura 8) y Es (compuesto 16- Figura 8), respectivamente, ya habían sido aislados y caracterizados. Por tanto, es bastante probable que alguno de los picos desconocidos correspondiera a estos compuestos o a otros biflavonoides menos polares que la Mo.

De esta forma se planteó como una estrategia viable y sencilla, determinar si alguno de los compuestos desconocidos correspondía a un glicósido hidrolizable de alguna de las agliconas conocidas (Mo, Vo o Am). Para esto se corrieron muestras paralelas hidrolizadas y no hidrolizadas de acuerdo a la metodología planteada. La Figura 12 y Figura 13 muestran a nivel cromatográfico y cuantitativo, respectivamente, la existencia de compuestos hidrolizables derivados principalmente de Mo y Vo.

A nivel cromatográfico (Figura 12), los cromatogramas en rojo corresponden a las muestras no hidrolizadas y en azul a las hidrolizadas. En general en todas las matrices evaluadas, los compuestos Mo (2) y Vo (3) aumentaron su respuesta en las muestras hidrolizadas. En contra parte, Fu (1), y los compuestos desconocidos 5 y 7 en tallos (Figura 12-A), y 5, 6 y 7 en hojas y semillas (Figura 12-B y C) disminuyeron su área. Si bien, la respuesta cromatográfica (área) no representa una medida comparativa equiparable entre los diferentes compuestos, es evidente para el caso de Mo y Fu, dos compuestos molarmente equiparables, que la pérdida de la respuesta del Fu en las muestras hidrolizadas, no explica totalmente el aumento de la respuesta de Mo, especialmente en matrices como tallos y semillas. Lo anterior sugiere la existencia de compuestos hidrolizables derivados de Mo, diferentes al Fu. De igual forma, la disminución en la respuesta de los compuesto desconocidos 5, 6 y 7, y el hecho de no encontrar picos nuevos en las muestras hidrolizadas, plantea la posibilidad de que estos compuestos sean derivados de las agliconas Mo y Vo, principalmente.

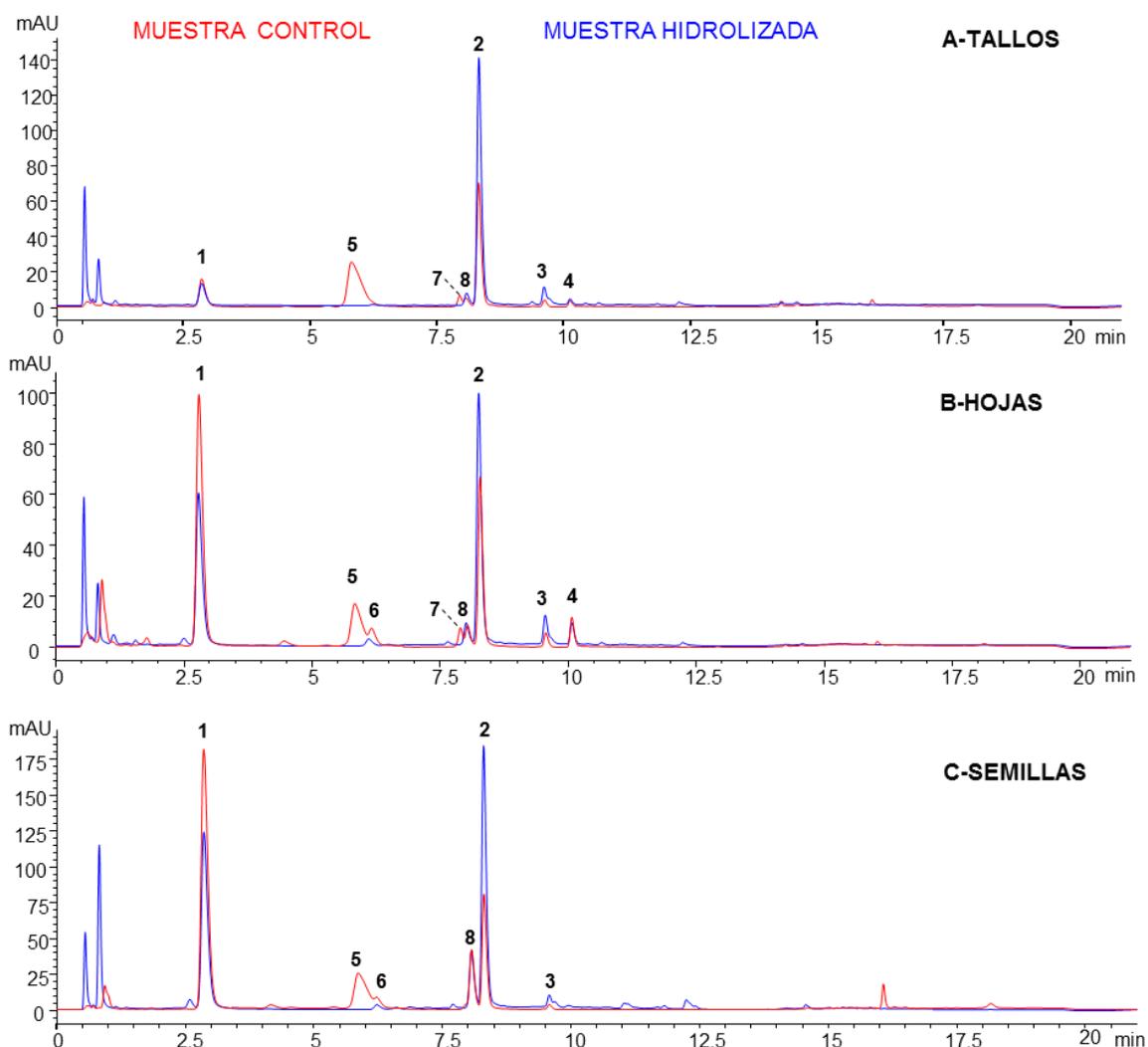


Figura 12. Perfil cromatográfico de muestras hidrolizadas y no hidrolizadas. A) Tallos, B) Hojas y C) Semillas de *G. madruno*. El número de los picos corresponde a los compuestos expuestos en la Figura 11.

En procura de obtener un resultado más representativo, las muestras hidrolizadas y no hidrolizadas fueron cuantificadas en términos de μmoles de biflavonoide por gramo de muestra. Con ello poder hacer comparaciones cuantitativas entre las moles formadas y perdidas entre cada uno de los compuestos hidrolizables y su respectiva aglicona (Figura 13). Como se observa para el caso de Mo y Fu, únicamente en la matriz epicarpio, la formación de Mo es explicada a causa de la hidrólisis del Fu; $43.5 \mu\text{mol/g}$ formadas de Mo a razón de $43.1 \mu\text{mol/g}$ hidrolizadas del Fu (Figura 13-C). En matrices como semillas y tallos, sin embargo, queda en evidencia que mediante la hidrólisis planteada, el principal compuesto hidrolizable formador de Mo no es Fu. De hecho, de las 32.1 y $15.4 \mu\text{mol/g}$ formadas de Mo en las muestras hidrolizadas de tallos y semilla respectivamente, solo

corresponden a la hidrólisis del Fu 1.4 y 3.0 $\mu\text{mol/g}$ en cada una de estas matrices (Figura 13-B y D). Por tanto, este resultado no solo evidencia que existen biflavonoides hidrolizables derivados de Mo diferentes al Fu, sino que estos se encontrarían en concentraciones significativas, comparables o en muchos casos superiores a Vo y Am.

Con respecto a Vo, en todas las matrices se evidenció un aumento de la concentración en las muestras hidrolizadas (Figura 13-E). Por lo tanto, algún o algunos de los compuestos desconocidos de tipo hidrolizable (compuestos 5, 6 y 7) corresponde a un derivado de este compuesto, que muy probablemente sea el Es (compuesto 16- Figura 8). A diferencia de las demás agliconas, Am tanto a nivel cromatográfico como en la evaluación cuantitativa, no presentó diferencias que sugirieran la presencia de algún derivado hidrolizable (Figura 12 y Figura 13). Por lo tanto, y de acuerdo a los resultados obtenidos, de los 4 compuestos desconocidos con mayores respuestas, observados en el perfil cromatográfico por HPLC-DAD (compuestos 5, 6, 7 y 8), tres corresponden a biflavonoides hidrolizables derivados de Mo o Vo.

En procura de un obtener un resultado más contundente se decidió realizar una identificación tentativa mediante un análisis por LC-MS de los extractos hidrolizados y no hidrolizados. Para esto, una vez optimizadas las condiciones de ionización de los compuestos Fu, Mo, Vo y Am con respecto al voltaje del capilar y el fragmentor, se procedió a realizar un análisis en modo "scan" de una muestra no hidrolizada de hojas de *G. madruno*. Con el fin de obtener una mayor especificidad hacia los biflavonoides y un menor ruido en la línea base, el monitoreo de los iones se realizó en una ventana entre 500 y 800 unidades de m/z . La Figura 14 presenta los principales resultados encontrados. En primera instancia, mediante la reducción del rango de masas, fue posible obtener cromatogramas similares entre las respuestas obtenidas por el DAD a 290 nm y el cuadrupolo simple (Figura 14-A). Observando en ambos casos los 8 picos de interés.

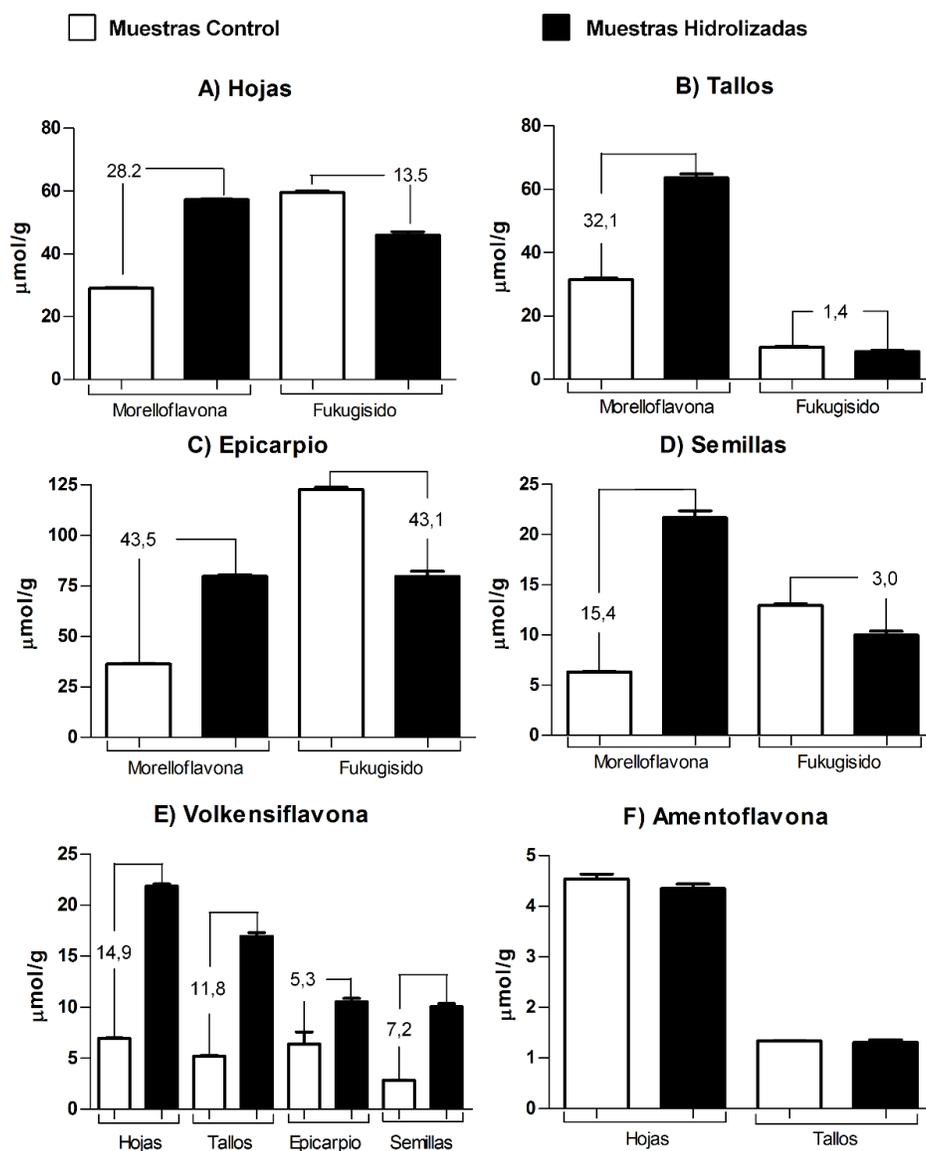


Figura 13. Evaluación cuantitativa de las muestras hidrolizadas y no hidrolizadas de las diferentes matrices de *G. madruno*. Las figuras A), B), C) y D) corresponden a la cuantificación de Mo y Fu en hojas, tallos, epicarpio y semillas, respectivamente. Las figuras E) y F) corresponden a la cuantificación de Vo y Am, respectivamente.

De acuerdo a los espectros de masas obtenidos, los compuestos 1, 2, 3 y 4 corresponden a los iones moleculares con la pérdida de un protón $[M-H]^-$ de los compuestos Fu (717 m/z), Mo (555 m/z), Vo (539 m/z) y Am (537 m/z), respectivamente (Figura 14-B, C, D y E), confirmándose la identificación previa realizada a los 4 biflavonoides de partida. Ahora, frente al análisis de los desconocidos, el espectro de masas del compuesto hidrolizable 6 (Figura 12), corresponde al $[M-H]^-$ del Es (701 m/z) (Figura 14-G), un biflavonoide glucosidado derivado de Vo previamente aislado e identificado [42,110]. Por su parte, el

pico 8, compuesto de características no hidrolizables (Figura 12), presenta un $[M-H]^-$ de 557 m/z (Figura 14-I), dos unidades mayor al $[M-H]^-$ de Mo. Por lo tanto, y teniendo presente la química del género, la polaridad de acuerdo a la ubicación en el cromatograma y la abundancia de biflavonoides encontrados en *G. madruno*, es probable que este pico corresponda a un biflavonoide no reportado en los estudios previos. Estructuralmente la ganancia de dos unidades de m/z con respecto a Mo, sugiere la pérdida del doble enlace entre los carbonos 2''- 3'' del flavonoide correspondiente a luteolina. Bajo esta condición, el biflavonoide resultante podría ser una biflavanona del grupo GB-1a, específicamente el biflavonoide GB-2a (compuesto 18-Figura 8), correspondiente al 3-8''-naringenileriodictiol. No obstante, y de acuerdo a la revisión realizada para los biflavonoides del género *Garcinia*, el biflavonoide GB-1 una flavanona-flavanonol (compuesto 9-Figura 8) podría ser también el compuesto atribuible al pico 8 por presentar un $[M-H]^-$ de 557 m/z . Sin embargo, se encontró un reporte preliminar, en donde se indica el aislamiento e identificación del biflavonoide GB-2a, tanto en la raíz como en el frutos de la especie *G. madruno* [192]. Por lo tanto, lo más probable es que el compuesto 8 corresponda al biflavonoide 3-8''-naringenileriodictiol.

Con respecto a los picos 5 y 7, los espectros encontrados no son concluyentes en relación a la determinación de un ion molecular que permita establecer una posible identificación conforme a los reportes de biflavonoide del género *Garcinia*. Es posible, por tanto, que los iones existentes sean productos de fragmentación derivados de una disociación inducida por colisión bajo las condiciones establecidas en la fuente de ionización y/o al producto de la coelución de compuestos en un mismo pico, generando de esta forma una diversidad en los iones encontrados. Sin embargo la presencia de los iones característicos $[M-H]^-$ de Mo y Vo en los espectros de masas de los compuestos 5 y 7, respectivamente, sugiere la presencia de derivados de estos dos biflavonoides. En adicción, los estudios de hidrolisis confirman que estos dos picos sufren una hidrolisis total (Figura 12), reafirmando de esta manera la posibilidad de que sean glicósidos hidrolizables de alguno de estos dos biflavonoides, con sustituciones adicionales, que bajo el proceso de ionización en la ESI sufren una fragmentación completa imposibilitando la detección de sus respectivos iones moleculares.

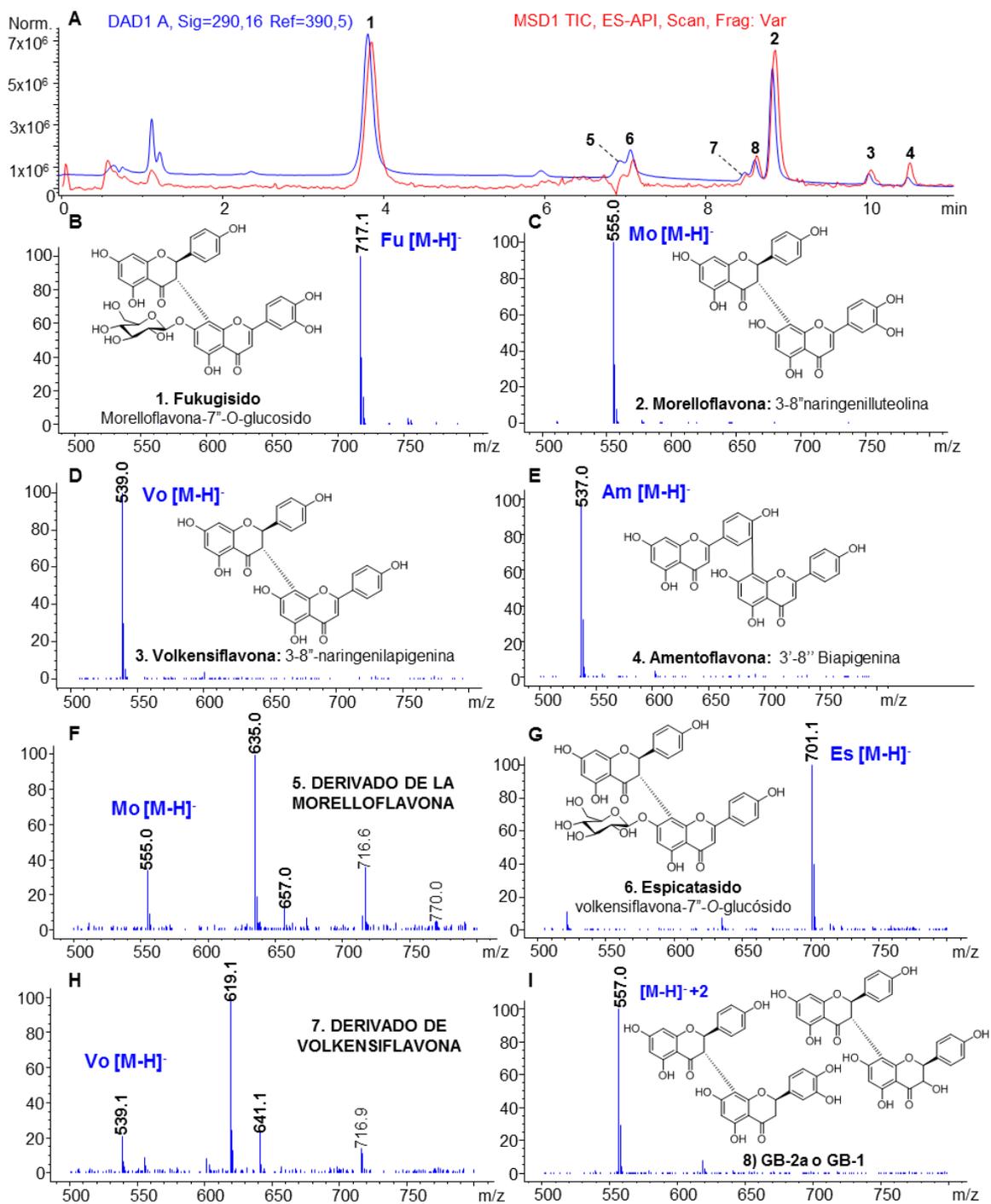


Figura 14. Análisis por LC-MS de los biflavonoides presentes en un extracto de hojas de *G. madruno*. A) cromatogramas simultáneos obtenidos a 290 nm (DAD-Azul) y en modo scan (TIC-rojo) en un HPLC-DAD-MS. Las figuras de la B) a la I) corresponden a los espectros de masas obtenidos de los picos 1 al 8 del cromatograma de iones totales (TIC-rojo).

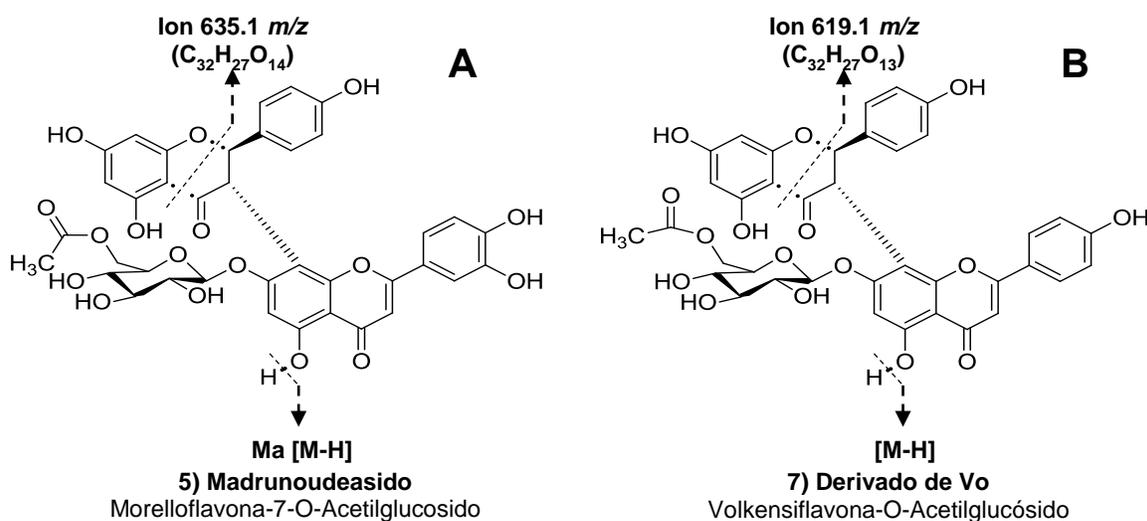


Figura 15. Esquema de fragmentación propuesto para los picos 5 y 7.

Como punto de partida para su respectiva identificación, se tomó al Ma (compuesto 14-Figura 8), una molécula aislada y caracterizada con anterioridad en hojas de *G. madruno* [42,110] y no identificada hasta el momento en el perfil cromatográfico. El cromatograma del ion extraído (EIC) correspondiente al [M-H]⁻ del Ma, no arrojó ningún resultado que sugiriera su presencia, pero de acuerdo a lo discutido, podría ser muy probable que este compuesto estuviera fraccionándose por completo en la ESI. Por lo tanto, la identificación se concentró principalmente en los iones mayoritarios de cada uno de los espectros de masas: 635 y 619 m/z para los picos 5 y 7, respectivamente. Partiendo de la estructura del Ma, un análisis de fragmentación demuestra que el ion 635 m/z del espectro de masas del pico 5 corresponde a un fragmento de este compuesto. El punto de ruptura se muestra en la Figura 15-A. Teniendo presente que entre el ion mayoritario (619 m/z) del espectro de masas del pico 7 y el [M-H]⁻ de Vo, existe la misma diferencia de masa en relación al ion mayoritario (635 m/z) del espectro de masas del pico 5 y el [M-H]⁻ de Mo, se plantea la posibilidad de que el pico 7 consista en un derivado similar al Ma pero con el núcleo Vo. Como resultado del proceso de fragmentación aplicado a un supuesto compuesto “volkenisflavona-O-acetilglucosido” en el mismo punto del Ma, se obtuvo un fragmento que correspondía al ion 619 m/z (Figura 15-B), sugiriendo así que el pico 7 podría ser un biflavonoide acetilglucósido derivado de Vo no reportado hasta el momento.

Los resultados obtenidos fueron evaluados por diferentes metodologías, soportando y aportando a la identificación planteada en este trabajo. No obstante, para establecer una identificación definitiva de los compuestos desconocidos, sería necesario realizar pruebas adicionales empleando metodologías espectroscópicas de mayor resolución que brinden información a nivel estructural. Entre las posibilidades se contempla el fraccionamiento

mediante HPLC semipreparativo/analítico y la posterior determinación estructural por RMN de los compuestos obtenidos, o la evaluación directa de los extractos mediante LC-Masas tándem preferiblemente con equipos de alta resolución, que permitan brindar una información más detallada de los aspectos estructurales mediante el análisis MS/MS o MSⁿ.

4.2.3 Evaluación cuantitativa de biflavonoides de *G. madruno*

4.2.3.1 Validación del método

La validación de este método fue realizada de acuerdo a lo estipulado en el numeral 4.1.4.2. Los parámetros evaluados fueron los siguientes: selectividad, linealidad y rango, límite de cuantificación (LOQ) y límite de cuantificación más bajo (LLOQ), variabilidad intra-día (repetibilidad), variabilidad inter-día (precisión intermedia), y exactitud evaluada a través de la veracidad y el sesgo del método.

En principio, la **selectividad** del método fue determinada con los estudios previos realizados hasta el momento. En la Figura 11-C se muestra el perfil cromatográfico obtenido en las 5 matrices de interés, evidenciándose una separación cromatográfica adecuada y la ausencia de picos adyacentes que dificulten el abordaje cuantitativo. Por otra parte la identificación y ausencia de coeluciones se determinó por LC-MS (Figura 14), en donde en las muestras ejecutadas los espectros de masa obtenidos no muestran iones que sugieran la presencia de otros compuestos en los picos de interés.

Por otra parte, el **rango** seleccionado para cada analito fue fijado de acuerdo a la respuesta cromatográfica y al contenido relativo de los biflavonoides. Esto con el fin de poder cuantificar de forma simultánea: Fu, Mo, Vo y Am, en una matriz, aplicando únicamente una dilución. En los rangos seleccionados (Tabla 1), se obtuvo una linealidad adecuada para cada compuesto, obteniendo como mínimo un $r^2 = 0.992$. Adicionalmente, en procura de determinar si existía homogeneidad de varianza entre los diferentes niveles seleccionados, cada curva se sometió a un test de Cochran. Partiendo de las respuestas normalizadas (y_i/x_i), en todos los casos el $G_{\text{experimental}}$ obtenido (ecuación 2) fue menor al G_{tablas} (Tabla 1). Este resultado indica que los niveles de concentración seleccionados no influyen en la varianza de las respuestas, cumpliendo de esta forma con uno de los supuestos del análisis de varianza (ANOVA) y de la estadística paramétrica.

Frente al **límite de cuantificación** (Tabla 1), el LLOQ se fijó como el nivel inferior del rango dinámico seleccionado, correspondiente al nivel más bajo alcanzado al cual es posible cuantificar (numeral 4.1.4.2), empleando el límite de cuantificación superior establecido en el rango. Para el caso de Mo y Fu, los dos biflavonoides que presentaron la mayor respuesta en las diferentes matrices, era necesario emplear un límite superior considerablemente alto,

para así poder garantizar que la mayor cantidad de las muestras pudieran ser interpoladas. De esta forma se escogió 200 µg/mL como límite superior. Bajo estas condiciones, la concentración más baja alcanzada que cumpliera con los criterios precisión y exactitud fue 5 µg/mL para ambos compuestos (LLOQ). Sin embargo, esto no indica que las condiciones de sensibilidad del equipo no permitan la cuantificación por debajo de este nivel de concentración. Por lo tanto, el LOQ se determinó como la concentración más baja alcanzada que cumpliera con los criterios establecidos empleando un rango de al menos 5 niveles de concentración con un límite superior de 5 µg/mL (Tabla 1). Con respecto a Vo y Am, el hecho de ser los compuestos con menor respuesta, los rangos se plantearon en procura de obtener el menor LLOQ posible, por tal razón no existen diferencias considerables entre los dos valores obtenidos, como si se observa con Mo y Fu (Tabla 1). De forma general el LLOQ estaría determinado por el método analítico planteado y el LOQ por la sensibilidad del equipo. Cabe resaltar que a nivel práctico y conforme a lo desarrollado en esta validación, serán muestras aptas para su cuantificación aquellas que se encuentren entre el LLOQ y el límite superior del rango establecido.

Tabla 1. Linealidad, rango dinámico y límites de cuantificación obtenidos.

| Pico | Nombre | λ (nm) | Curva de calibración | r ² | G exp | RD (µg/mL) | LLOQ (µg/mL) | LOQ (µg/mL) |
|------|--------|--------|----------------------|----------------|--------------------|------------|--------------|-------------|
| 1 | Fu | 290 | Y= 9.691x – 8.254 | 0.9992 | 0.337 ^a | 5-200 | 5 | 0.625 |
| 2 | Mo | 290 | Y= 6.635x – 7.987 | 0.9984 | 0.444 ^a | 5-200 | 5 | 0.625 |
| 3 | Vo | 290 | Y= 3.671x -0.479 | 0.9927 | 0.349 ^b | 0.625-35 | 0.625 | 0.625 |
| 4 | Am | 335 | Y= 19.90x – 9.850 | 0.9961 | 0.441 ^c | 1.25-35 | 1.25 | 0.625 |

G_{tablas} = 0.561^a; 0.616^b; 0.683^c.

En la Tabla 2, se muestra un resumen de la **precisión** intra-e-inter- día. Los resultados obtenidos fueron satisfactorios para todo los analitos en todas las matrices evaluadas, alcanzando valores inferiores al 10 % y al 15% (CV), respectivamente, cumpliendo de esta forma los criterios de aceptación establecidos. Por otro lado, no se observa un efecto significativo de alguna matriz en la precisión general del método. En cuanto a la **exactitud**, se evaluó la veracidad y el sesgo de cada uno de los analitos a tres concentraciones diferentes (n=9) (Tabla 2). En todos los casos el %ER fue menor al 10 % y los valores obtenidos del t_{calculado} fueron menores al t_{critico}. De esta forma en general el método desarrollado es veraz, presenta poca dispersión en los resultados obtenidos en diferentes días y analistas empleados, y por último que no existe un sesgo representativo atribuible a los errores sistemáticos del método.

Tabla 2. Precisión y exactitud del método

| Analitos | Morelloflavona | Fukugisido | Volkensiflavona | Amentoflavona | | | | |
|-----------------------------|------------------|--------------------------------|------------------|--------------------------------|------------------|--------------------------------|------------------|--------------------------------|
| PRECISIÓN (%CV), n=6 | | | | | | | | |
| Semillas | | | | | | | | |
| <i>P. intra-día</i>) | 0.76 | 3.38 | 1.28 | - | | | | |
| <i>P. inter-día</i> | 1.38 | 3.95 | 1.57 | - | | | | |
| Tallos | | | | | | | | |
| <i>P. intra-día</i>) | 3.17 | 4.31 | 4.73 | 4.18 | | | | |
| <i>P. inter-día</i>) | 2.65 | 5.56 | 3.37 | 12.4 | | | | |
| Hojas | | | | | | | | |
| <i>P. intra-día</i> | 3.73 | 1.37 | 3.77 | 6.34 | | | | |
| <i>P. inter-día</i> | 7.12 | 6.20 | 6.69 | 11.8 | | | | |
| Epicarpio | | | | | | | | |
| <i>P. intra-día</i> | 5.32 | 5.05 | 5.31 | - | | | | |
| <i>P. inter-día</i>) | 4.94 | 5.19 | 4.64 | - | | | | |
| Mesocarpio | | | | | | | | |
| <i>P. intra-día</i> | 8.76 | 4.95 | 5.69 | - | | | | |
| <i>P. inter-día</i> | 11.31 | 7.38 | 6.13 | - | | | | |
| EXACTITUD, n=9 | | | | | | | | |
| | Veracidad | Sesgo^d | Veracidad | Sesgo^d | Veracidad | Sesgo^d | Veracidad | Sesgo^d |
| | [%ER] | (T_{calculado}) | [%ER] | (T_{calculado}) | [%ER] | (T_{calculado}) | [%ER] | (T_{calculado}) |
| <i>N. bajo^a</i> | 4.77 | 0.155 | 5.84 | 0.136 | 6.72 | 0.096 | 6.74 | 0.476 |
| <i>N. medio^b</i> | 5.81 | 0.312 | 4.28 | 0.311 | 8.92 | 0.174 | 7.02 | 0.705 |
| <i>N. alto^c</i> | 2.19 | 0.013 | 1.75 | 0.053 | 5.47 | 0.242 | 1.74 | 0.123 |

^a 10 µg/mL para Fu y Mo, y 1.25 µg/mL para Vo y Am

^b 50 µg/mL para Fu y Mo, 5 para µg/mL para Vo y Am

^c 200 µg/mL para Fu y Mo, 35 µg/mL para Vo y Am

^d $t_{\text{crítico}} = 2.306$ a un $\alpha = 0.05$ a dos colas, con 8 grados de libertad.

4.2.3.2 Biflavonoides de *G. madruno*

Empleando el método desarrollado por LC-DAD/MS, las matrices de las partes aéreas de *G. madruno* (Hojas, Tallos, Epicarpio, Mesocarpio y Semillas) fueron analizadas con respecto al contenido y expresión de biflavonoides. Los resultados generales muestran grandes diferencias entre las matrices tanto a nivel cuantitativo como cualitativo. En cuanto a los perfiles cromatográficos obtenidos por HPLC-DAD (290 nm) (Figura 11-C), las principales diferencias cualitativas encontradas recaen sobre la expresión de los compuestos 4 (Am) 7 (derivado de Vo), principalmente. De manera muy particular, en ninguna de las matrices del fruto se aprecia el pico representativo de Am y específicamente en el epicarpio y en el mesocarpio el compuesto 7 prácticamente no es detectable. En general el mesocarpio es la matriz con menos picos observados y a pesar de contar con un alto contenido de agua, no se observan los principales glicósidos de los biflavonoides. Los cromatogramas obtenidos para tallos, hojas y semillas, por su parte, muestran un comportamiento similar expresando los 8 compuestos de interés. Las principales diferencias radican, en que en los tallos, la respuesta del compuesto 6 (Es) se encuentra

prácticamente absorbida por la del compuesto 5 (Ma) y en las semillas se presentan una serie de picos desconocidos entre un tiempo de retención de 15 y 20 minutos. De acuerdo a los reportes del género y a los tiempos de retención presentados, estos picos probablemente correspondan a compuesto más apolares que los biflavonoides como las benzofenonas y/o las xantonas. En los estudios previos realizados por el grupo no se aislaron compuestos pertenecientes a estos grupos de metabolitos, sin embargo existe un reporte preliminar que menciona la presencia de xantocimol (compuesto 7-Figura 8), una benzofenona preñalada en los frutos de *G. madruno* [192]. De igual forma, analizando las respuestas de cada pico, únicamente estos compuestos son equiparables con la de los biflavonoides en las semillas, en las demás matrices prácticamente no son detectables.

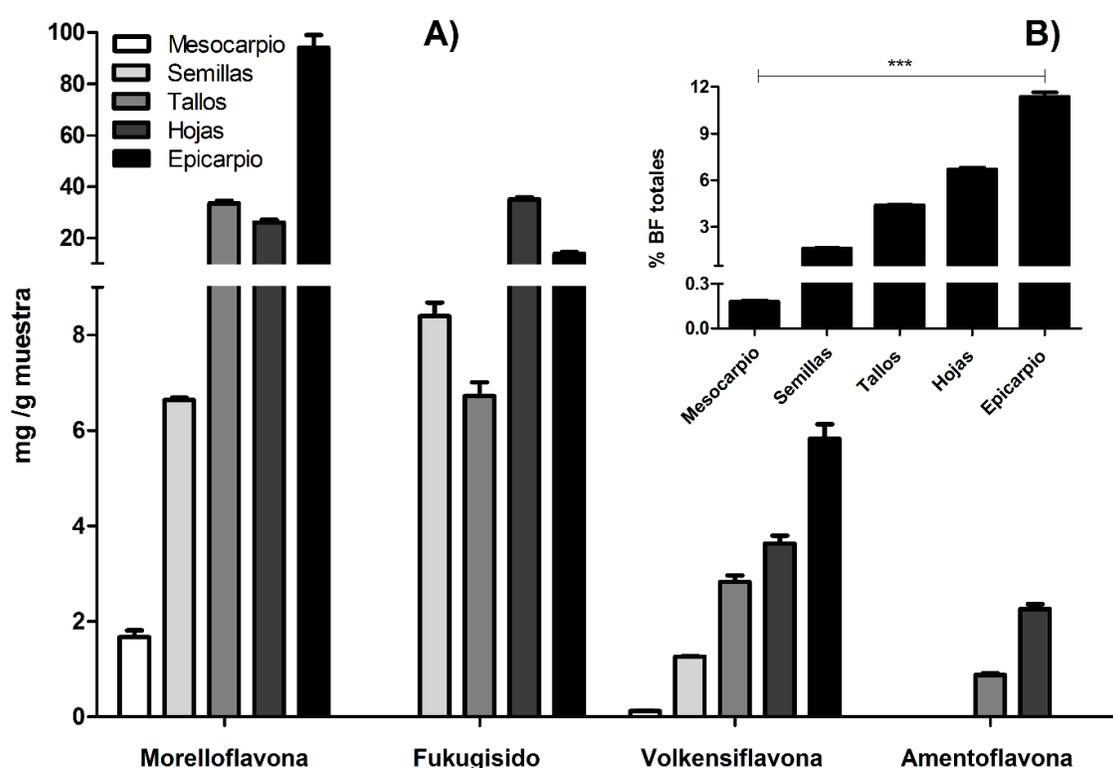


Figura 16. Contenido de biflavonoides en las diferentes matrices de *G. madruno*. (A) Cuantificación de Mo, Vo, Am y Fu en las 5 matrices de *G. madruno* (mg/g muestra). B) Porcentaje de biflavonoides totales en las muestras de análisis. De acuerdo a un análisis de varianza (ANOVA) existe una diferencia altamente significativa ($p < 0.001$) entre el contenido de cada biflavonoide en las diferentes matrices, así como en el porcentaje total de biflavonoides.

A nivel cuantitativo (Figura 16), los compuestos mayoritarios encontrados fueron Mo y Fu, existiendo diferencias apreciables con respecto al contenido de Vo y Am. En epicarpio, mesocarpio y tallos, Mo fue el compuesto con mayor contenido, a diferencia de las semillas y hojas en donde Fu fue el compuesto mayoritario. Con respecto a Mo, el contenido vario entre 94.02 y 1.67 mg/g de muestra en base seca, decreciendo en el siguiente orden:

Epicarpio>Tallos>Hojas>Semillas>Mesocarpio. En comparación con Mo, el contenido de Fu fue menor variando en un rango de 35.05 a 6.72 mg/g de muestra en base seca, en el siguiente orden decreciente: Hojas>Epicarpio>Semillas>Tallos. En el mesocarpio a pesar de haber sido detectado, la respuesta obtenida fue inferior al LLOQ (Tabla 1), por lo cual no fue posible realizar su cuantificación. En cuanto a Vo, el tercer biflavonoide en contenido, el rango de variabilidad comprendió entre 5.83 mg y 0.12 mg/g de muestra en base seca, siendo el epicarpio la matriz que presentó el mayor contenido, seguido de las hojas, tallos, semillas y finalmente el mesocarpio. Finalmente la Am, el biflavonoide en menor cantidad encontrado en *G. madruno*, únicamente fue cuantificado en hojas y tallos presentando un contenido de 2.25 y 0.88 mg/g de muestra en base seca, respectivamente. Tal como se había comentado con anterioridad, en las matrices provenientes del fruto no fue posible detectar el pico correspondiente de Am. Adicionalmente en procura de dimensionar el contenido de biflavonoides totales en *G. madruno*, se determinó el porcentaje (P/P) resultante de la suma de cada biflavonoide (Figura 16-B). Entre las matrices evaluadas, el porcentaje de biflavonoides totales varió en un rango entre 11.4 y 0.18 %, siendo el epicarpio la matriz que presentó el mayor contenido, seguido de las hojas, tallos, semillas y mesocarpio. La relevancia a nivel cuantitativo de Mo y Fu, es tal, que en todas las matrices, la suma del contenido de estos dos compuestos representa más del 90 % del contenido total de biflavonoides. De hecho, del 11.4 % de biflavonoides en el epicarpio, 9.4 % corresponden solo a Mo.

Los resultados obtenidos a nivel cuantitativo de los biflavonoides de *G. madruno* son altamente relevantes. Si bien no existen muchas aproximaciones metodológicas de tipo cuantitativo que determinen el contenido de este grupo de compuestos en especies de *Garcinia* y en otros géneros, hasta el momento, en lo que concierne a esta revisión, no se encontró ninguna especie reportada con un contenido equiparable de biflavonoides, como el encontrado en este trabajo. En cuanto al género *Garcinia*, un trabajo previo realizado determinó el contenido de Mo, Vo, Am y Fu en frutas de *G. spicata*, *G. xanthochymus*, *G. intermedia*, *G. livingstonei*, *G. aristata*, *G. hombriana*, *G. kola* y *G. mangostana* [114]. Como resultado, el mayor % de biflavonoides encontrado fue únicamente de 2.4 % para la especie *G. xanthochymus*. Para las demás especies, en muchos de los casos no alcanzaron ni el 1 %. Por otro lado, en especies diferentes al género *Garcinia* el panorama es similar. Por ejemplo, en *Ginkgo Biloba*, el contenido de biflavonoides totales alcanza únicamente el 1.68% en extractos optimizados [193]. En especies del género *Selaginella*, los biflavonoides amentoflavona y robustaflavona son los compuestos mayoritarios, sin embargo su contenido no alcanza ni al 1% [194]. Comportamiento similar al encontrado en la especie *Hypericum perforatum*, en donde el biflavonoide mayoritario (I3, II8-biapigenin) se ha encontrado en rangos inferiores a este porcentaje [195]. Adicionalmente, teniendo presente que el porcentaje de biflavonoides reportado en las diferentes matrices de *G. madruno*, esta

subestimado por los compuestos no cuantificados e identificados como biflavonoides (compuestos 5, 6, 7, y 8). El contenido total de biflavonoides, especialmente en hojas y epicarpio, podría equipararse con lo reportado en especies reconocidas por su alta expresión y contenido de flavonoides, como es el caso del cacao y el té, en donde se reportan contenidos cercanos al 20 % de catequinas en granos y hojas respectivamente [186,196–198].

De esta forma, los resultados obtenidos postulan a *G. madruno* como una de las especie referentes del género *Garcinia* en la expresión de biflavonoides, especialmente aquellos de tipo morelloflavona. Así, se destacan las hojas como la fuente principal en diversidad de biflavonoides y el epicarpio como la matriz con mayor contenido de biflavonoides totales, esta última siendo principalmente una fuente relevante de Mo y Fu. Por lo tanto, de forma general, los resultados cuali-cuantitativos de biflavonoides de *G. madruno* se constituyen como el punto de partida para promover el desarrollo de ingredientes funcionales empleando *G. madruno* como materia prima.

5 DESARROLLO DE EXTRACTOS OPTIMIZADOS CON ALTOS CONTENIDOS DE BIFLAVONOIDES A PARTIR DE *GARCINIA MADRUNO*

5.1 MATERIALES Y MÉTODOS

5.1.1 Optimización de la extracción

5.1.1.1 *Determinación de los factores más influyentes en la extracción de biflavonoides.*

Mediante diseños experimentales de uno y dos factores se evaluó la pertinencia de los principales factores involucrados en la extracción asistida por ultrasonido (UAE) de los biflavonoides Mo, Vo, Fu y Am. En la Tabla 3 se resume las condiciones aplicadas para cada corrido experimental. En total se realizaron 30 corridos cada uno de ellos evaluado por triplicado para un total de 90 determinaciones. Entre los corridos del 1 al 19, se evaluó conjuntamente el efecto del tipo de solvente orgánico utilizado (etanol, isopropanol y acetona) con la proporción de agua (%) incluida en este. Para estos corridos las condiciones de los demás factores (tiempo de extracción y pH) se fijaron en un valor constante. En los corridos del 20 al 27 se evaluó el efecto del tiempo de extracción en un rango de 0 a 60 minutos, utilizando el solvente y la proporción de agua más adecuados, con base a los resultados obtenidos en los experimentos anteriores. Finalmente del corrido 28 al 30 se evaluó el efecto del pH del agua adicionada en un rango entre 3 y 9, fijando las demás variables acorde a los resultados obtenidos en los ensayos anteriores.

Como muestra de análisis se utilizaron las hojas de *G. madruno*. Para todos los corridos y replicas se empleó el procedimiento general descrito en el numeral 4.1.3.1, con la salvedad de la utilización de los valores de las variables descritas en la Tabla 3. Adicionalmente cada corrido experimental se cuantificó en términos del contenido de biflavonoides individuales y totales conforme al numeral 4.1.4. Los resultados finalmente se analizaron mediante estadística paramétrica, empleando análisis univariados y análisis de varianza (ANOVA) en pro de determinar los factores más influyentes y los posibles rangos de variabilidad adecuados para ser utilizados en un diseño experimental multifactorial. Para esto se empleó una plataforma de software estadísticos compuesta por Statgraphics Centurion XVI (Statgraphics Centurion XVI Software Versión 16.0.07 para Windows, Statpoint Technologies, Inc) y GraphPad Prism software (GraphPad Software, Inc., San Diego, CA).

Tabla 3. Diseño experimental para la evaluación de los factores más influyentes en la extracción

| Corrido experimental | Factor evaluado | Condiciones empleadas | | | |
|----------------------|-----------------------------------------------------------------|-----------------------|--------|--------------|---------------|
| | | Solvente | % agua | Tiempo (min) | pH |
| 1 | | | 0 | | |
| 2 | | | 15 | | |
| 3 | | | 30 | | |
| 4 | | Etanol | 45 | | |
| 5 | | | 60 | | |
| 6 | | | 85 | | |
| 7 | | | 0 | | |
| 8 | | | 15 | | |
| 9 | Evaluación del solvente y la proporción de agua empleada | Isopropanol | 30 | 60 | No controlado |
| 10 | | | 45 | | |
| 11 | | | 60 | | |
| 12 | | | 85 | | |
| 13 | | | 0 | | |
| 14 | | | 15 | | |
| 15 | | Acetona | 30 | | |
| 16 | | | 45 | | |
| 17 | | | 60 | | |
| 18 | | | 85 | | |
| 19 | | Agua | 100 | | |
| 20 | | | | 0 | |
| 21 | | | | 10 | |
| 22 | | | | 20 | |
| 23 | Tiempo de Extracción | Etanol | 30 | 30 | No controlado |
| 24 | | | | 45 | |
| 25 | | | | 60 | |
| 26 | | | | 90 | |
| 27 | | | | 120 | |
| 28 | | | | | 3 |
| 29 | pH del agua | Etanol | 30 | 60 | 7 |
| 30 | | | | | 9 |

5.1.1.2 Optimización de la extracción mediante la metodología de superficie de respuesta.

Una vez determinadas las variables independientes (x) y sus respectivos rangos de variabilidad acorde a los resultados obtenidos en el numeral anterior, la optimización de la extracción de los biflavonoides (Mo, Vo, Am, y Fu) se realizó por medio de un diseño experimental fraccionado Box-Behnken (BBD), 3^3 (3 variables independientes con 3 niveles cada una -Tabla 4), aleatorizado y en dos bloques. Como resultado un total de 30 corridos fueron necesarios, discriminados en 15 corridos por bloque, con 3 puntos centrales cada

uno. Como respuestas de cada corrido (y) se utilizó el contenido en mg de Mo, Vo, Am, y Fu por gramo de muestra seca de hojas de *G. madruno*.

La siguiente ecuación muestra el modelo de regresión polinomial de segundo orden propuesto para el análisis de las diferentes superficies de respuesta obtenidas, en relación al comportamiento de las respuestas conforme a la variación de los factores.

$$Y = \beta_0 + \sum_{i=1}^k \beta_i X_i + \sum_i^k \beta_{ii} X_i^2 + \sum_i^{k-1} \sum_j^k \beta_{ij} X_i X_j \quad (\text{Ecuación 4})$$

En donde β representa cada uno de los coeficientes de regresión para cada término de la ecuación, siendo β_0 , β_i , β_{ii} y β_{ij} los coeficientes respectivos de los términos del intercepto, los lineales, cuadráticos y del producto de las interacciones entre factores. Mientras tanto X_i y X_j representan los valores de cada una de las variables independientes y k el número de factores evaluados ($k=3$). Finalmente todos los experimentos se realizaron por triplicado y el análisis estadístico respectivo y la optimización del modelo se realizó utilizando el software Statgraphics Centurion XVI (Statgraphics Centurion XVI Software Versión 16.0.07 para Windows, Statpoint Technologies, Inc). Adicionalmente para la confirmación experimental del modelo, se evaluaron tres muestras independientes de hojas aplicando los valores optimizados de cada variable independiente.

Tabla 4. Variables y niveles utilizados en el BBD

| Variables | Nivel | | |
|-----------------------------------------|-----------|-----------|----------|
| | Bajo (-1) | Medio (0) | Alto (1) |
| Tiempo de extracción (X_1 - minutos) | 5 | 40 | 75 |
| Contenido de agua (X_2 -%) | 5 | 25 | 45 |
| Relación líquido/sólido (X_3 -mL/g) | 5 | 10 | 15 |

5.1.2 Eliminación de interferencias

5.1.2.1 Compuestos apolares y clorofilas

Para la eliminación de interferencias de tipo apolar, se diseñó un experimento de un solo factor en procura de promover la precipitación de este tipo de compuestos. La metodología empleada se basó en la obtención de extractos bajo el procedimiento optimizado con ciertas diferencias (numeral 4.1.3.1). Del sobrenadante obtenido justo después de la primera centrifugación, se tomaron 500 μ L del extracto, a los cuales se les agregó el 0, 20, 40, 50, 60, 70, 85, 100, 150, y 200 % de agua con respecto al volumen inicial tomado. La mezcla obtenida se agitó en vortex por 1 minuto y se centrifugó bajo las condiciones ya

establecidas. El sobrenadante fue retirado, transvasado a un nuevo vial y concentrado a sequedad en un centrivap a 45°C por 60 minutos. El residuo sólido obtenido fue pesado, reconstituido en 2.0 mL de solución extractora y se cuantificó conforme a lo expuesto con antelación. El análisis de cada nivel de agua agregada fue realizado por triplicado y como respuesta se tomó la masa del extracto obtenido y el contenido de biflavonoides (mg) por gramo de extracto optimizado.

5.1.2.2 *Compuestos polares*

La posible presencia de mono, oligo y/o polisacáridos, así como de ácidos orgánicos en grandes cantidades, especialmente en matrices como el epicarpio y el mesocarpio, motivo el desarrollo de un nuevo proceso de “Clean Up” en busca de la eliminación de estos compuestos de características más polares que los biflavonoides. Para esto, un nuevo BBD fue planteado, con el fin de evaluar el efecto del tiempo de extracción (X_1), el pH del agua acidulada con ácido cítrico (X_2) y la temperatura de extracción empleada (X_3) en la eficiencia de la extracción de compuestos polares y así, la consecuente concentración de los extractos en términos del contenido de biflavonoides. En la Tabla 5 se muestran los factores y niveles empleados en el BBD. Como respuestas se tomaron el contenido en mg de biflavonoides totales (sumatoria del contenido de Mo, Vo, Am y Fu) por gramos de extracto optimizado seco (y_1), la masa de extracto obtenido (y_2), y los mg de biflavonoides totales perdidos por g muestra empleado en el proceso de extracción adicional (y_3). A nivel metodológico los corridos experimentales se realizaron de la siguiente forma: 100 mg de muestra de epicarpio fueron extraídos con 1.5 mL de una solución acidulada con ácido cítrico, el pH, el tiempo de extracción y la temperatura de extracción empleada en la UAE, se realizó conforme a lo estipulado en los diferentes corridos del BBD (Tabla 8). Una vez culminada la extracción, los extractos se centrifugaron, el sobrenadante obtenido se retiró y cuantificó en términos de biflavonoides totales obteniendo de esta forma la respuesta y_3 . El residuo sólido obtenido fue sometido al proceso de extracción de biflavonoides tal como se expresa en el numeral 4.1.3.1. Una vez finalizada la primera centrifugación de este proceso, el sobrenadante obtenido se retiró y concentró a sequedad en un centrivap a 45°C por 60 minutos. El residuo sólido producto de este proceso se pesó (respuesta y_2), reconstituyó en 2.0 mL de solución extractora y cuantificó conforme a lo expuesto con antelación (respuesta y_1). Cada corrido experimental se realizó por triplicado, y el análisis estadístico respectivo y la optimización del modelo se realizó utilizando el software Statgraphics Centurion XVI (Statgraphics Centurion XVI Software Versión 16.0.07 para Windows, Statpoint Technologies, Inc).

Tabla 5. Variables y niveles utilizados en el BBD del “clean up” de compuestos polares

| Variables | Nivel | | |
|------------------------------------|-----------|-----------|----------|
| | Bajo (-1) | Medio (0) | Alto (1) |
| Tiempo de extracción (X1- minutos) | 0 | 5 | 10 |
| pH del agua (X2) | 2 | 3.5 | 5 |
| Temperatura de extracción (X3-°C) | 25 | 40 | 55 |

5.2 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

5.2.1 Determinación de los factores más influyentes en la extracción de biflavonoides.

En la actualidad, la Extracción Asistida por Ultrasonido (EAU) es una de las técnicas más empleadas para la extracción de flavonoides a partir de alimentos y productos naturales. Entre múltiples ventajas, la EAU es una técnica reconocida por ser efectiva, amigable con el medio ambiente, segura, económica, y capaz de obtener mayores rendimientos a consta de una disminución del tiempo de extracción [199–201]. Su eficacia radica en su mecanismo intrínseco, específicamente en la cavitación ultrasónica generada y los cambios consecuentes a nivel físico y químico que favorecen el proceso de difusión sólido-líquido. Las ondas ultrasónicas generadas en este proceso, promueven la producción de burbujas de cavitación. El colapso de estas burbujas, produce un gran aumento en la presión y la temperatura a nivel local, lo que facilita la destrucción de la superficie del material, permitiendo el contacto con el solvente de extracción, y así el subsecuente proceso de difusión y solubilidad [202,203]. Adicionalmente para alcanzar la mayor eficiencia en un proceso de EAU, está ampliamente documentado la importancia en determinar, fijar y optimizar, previamente los factores más influyentes involucrados en este proceso. La frecuencia, la temperatura, el tiempo de extracción, el solvente orgánico, el contenido de agua, el pH y la relación masa-volumen, son algunos de los factores ampliamente optimizados en los procesos de extracción de flavonoides y compuestos fenólicos por EAU [199,201,204–209].

En nuestro caso, partiendo de experimentos de uno y dos factores, sobre la matriz hojas, se determinó la influencia y los rangos de variabilidad de los principales factores modificables involucrados en el proceso de EAU (Tabla 3 y Figura 17). En las Figura 17-A-1, 2, 3 y 4 se muestra el efecto del tipo de solvente orgánico y el % de agua utilizado en la extracción de Fu, Mo, Vo y Am, respectivamente. En general, se observa un aumento en la extracción de los biflavonoides con los tres solventes utilizados a medida que se incrementa el % de agua en el solvente, hasta un punto, en donde decae drásticamente, alcanzando los valores más bajos a un 100% de agua. En cuanto a los solventes utilizados, en todos

los analitos, el etanol mostro el mejor perfil de extracción obteniendo los valores máximos a un rango de % de agua entre el 15 y el 30%. Con respecto al isopropanol y la acetona, el comportamiento de ambos fue similar, alcanzado sus máximos de extracción en un rango amplio alrededor de $45 \pm 20\%$ de agua. En general no existen diferencias estadísticamente significativas (ANOVA-Valor $p > 0.05$) en los puntos máximos de cada uno de los solventes utilizados. Sin embargo, en lo que respecta al trabajo restante, se seleccionó al etanol en una proporción de agua a determinar en un rango entre 5-45%, como solvente de partida. Esto debido principalmente a tres razones: i) el etanol presenta una mayor eficiencia en la extracción, ii) contiene un menor rango de máxima respuesta, lo cual asegura una mayor variabilidad al momento de realizar el DDE, y iii) es un solvente considerado como seguro y usado comúnmente en la industria alimentaria, cosmética y fitofarmacéutica sin restricciones significativas [200,210].

En cuanto a la evaluación de la influencia del tiempo en la extracción de los biflavonoides (Figura 17-B), los compuestos Fu, Mo y Vo muestran un aumento significativo respecto a la cantidad extraída de biflavonoides durante aproximadamente los primeros 15 minutos de extracción, después de este tiempo se aprecia un incremento ligero, que de acuerdo a un análisis ANOVA, no es significativo (valor $p > 0.05$). En el caso de la extracción de Am, el aumento del tiempo si juega un rol significativo (valor $p > 0.05$) en todo el rango evaluado (0 a 120 minutos). De esta forma, en pro de satisfacer las necesidades de todos los biflavonoides, se seleccionó un rango de variabilidad entre 5 y 75 minutos, asegurando de esta forma encontrar el tiempo óptimo requerido para Am, sin poner en riesgo la estabilidad de los demás compuestos.

Los biflavonoides evaluados se caracterizan por ser ácidos débiles con pKa entre 6 y 7 (www.chemicalize.org). Teniendo presente el aumento de la solubilidad de los flavonoides conforme aumenta el pH a causa del proceso de ionización, en este trabajo se decidió evaluar el posible efecto que podría tener el pH en la extracción de estos compuestos (Figura 17-C). Como se aprecia, los compuestos Fu, Vo y Am no muestran ningún cambio aparente en el rango de pH evaluado (3 a 9). En el caso de Mo, si se observa un aumento ligero en la extracción de este compuesto conforme aumenta el pH, sin embargo el valor p obtenido de un análisis de varianza ANOVA entre cada uno los grupos evaluado fue mayor a 0.05, indicando que no existen diferencias estadísticamente significativas entre ellos. Por lo cual, el pH no fue tenido en cuenta como variable a optimizar, optando por utilizar en los ensayos posteriores, el agua sin modificación alguna en su valor nominal de pH.

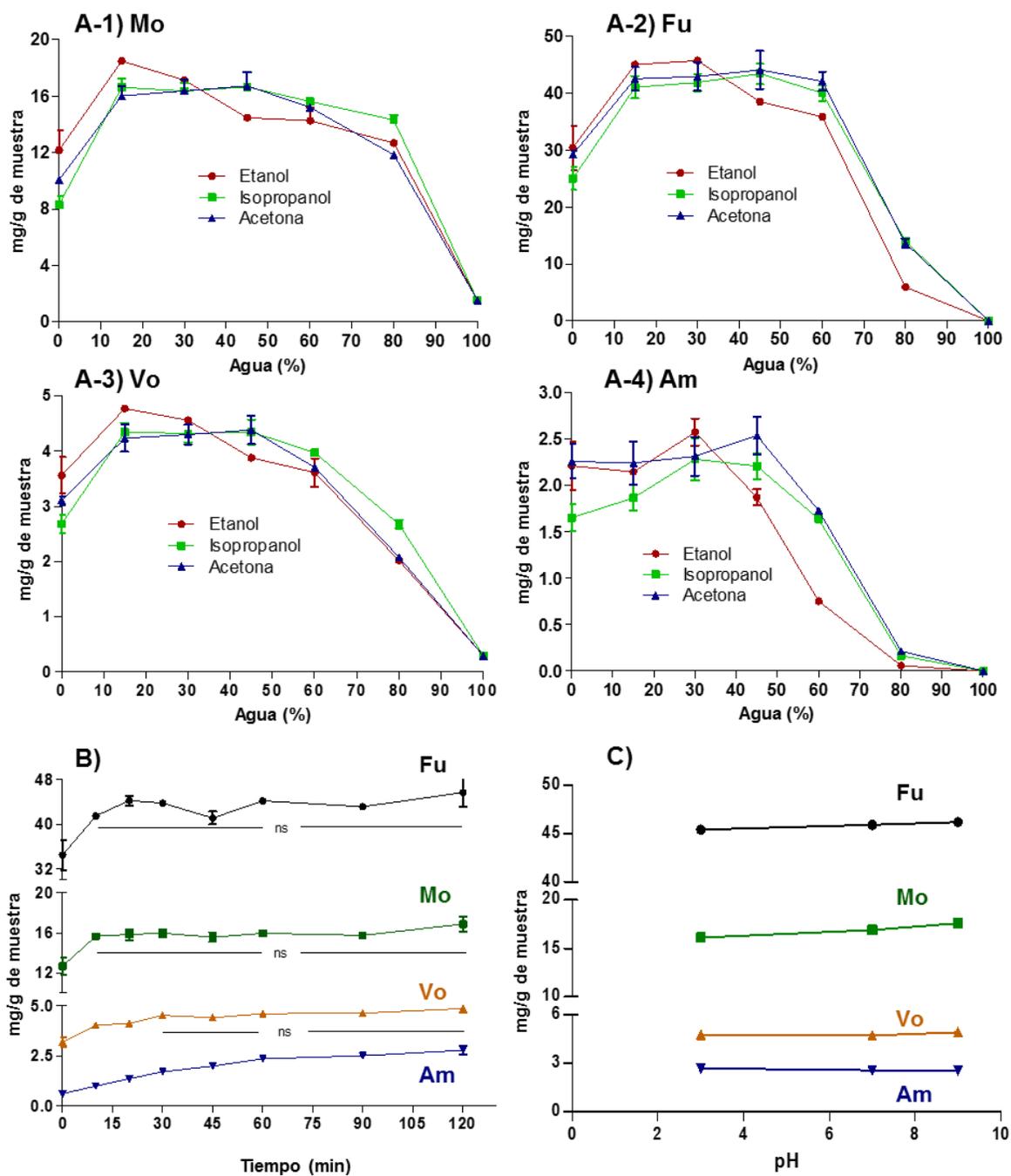


Figura 17. Efecto del tiempo, solvente orgánico proporción de agua y pH en la extracción de los biflavonoides. A) Efecto del solvente sobre la extracción de Mo (A-1), Fu (A-2), Vo (A-3) y Am (A-3). B) Efecto del tiempo de extracción y C) efecto del pH. Las condiciones empleadas en cada experimento se detallan en la Tabla 3.

5.2.2 Optimización de la extracción mediante la metodología de superficie de respuesta (RSM)

Con el objetivo de obtener el modelo más representativo y realístico del comportamiento de las diferentes variables frente a las respuestas seleccionadas (contenido de Fu, Mo, Vo y Am), fue pertinente realizar los ensayos preliminares del comportamiento de las diferentes variables en procura de determinar los factores más influyentes en el proceso y los rangos respectivos de estos. Estos últimos preferiblemente deben garantizar la inclusión de los puntos de máximo rendimiento y conferir a su vez una variabilidad significativa en el rango empleado. Como resultado del numeral anterior, se seleccionaron las siguientes variables con sus respectivos rangos: (X_1) tiempo de extracción (5-75 minutos) y (X_2) porcentaje de agua empleando etanol como solvente orgánico (5-45 %). La tercera variable (X_3) relación volumen de solvente por masa de muestra utilizada (5-15 ml solvente/g muestra) se seleccionó por la importancia reportada en trabajos con moléculas similares [211]. Por su parte los rangos establecidos se determinaron como el máximo y mínimo valor realizable conforme a la capacidad operativa del método planteado.

Tradicionalmente la optimización de las variables influyentes en los procesos de extracción de metabolitos a partir de matrices vegetales, se realizaba mediante la evaluación de un solo factor a la vez. Esta metodología se caracteriza principalmente por ser tiempo dependiente y poco costo-efectiva. Adicionalmente, posibles interacciones entre las variables no podían evaluarse, por lo cual los resultados obtenidos podían ser poco concluyentes. Actualmente la metodología de superficie de respuesta (RSM) tiene la capacidad de mitigar estas dificultades, convirtiéndose es una estrategia viable, costo-efectiva y precisa para la evaluación de múltiples variables en la optimización de este tipo de procesos [204]. Bajo este panorama y en lo que confiere al trabajo realizado, la RSM representaba el método más idóneo para optimizar de forma conjunta las tres variables independientes seleccionadas. Sin embargo, diferentes diseños experimentales han sido empleados a la hora de realizar un RSM. Entre estos se destacan los diseños experimentales factoriales completas (DFC) y los diseñados fraccionados, especialmente el diseño Box–Behnken (BBD) y el diseño de componentes centrales (CCD).

Para optimizar la cantidad extraída de los 4 biflavonoides de interés con las variables y rangos establecidos (Tabla 4), se seleccionó el BBD por encima del CCD y el DFC, debido principalmente a ser este un diseño ampliamente empleado en procesos de extracción de flavonoides, presentar el menor número de corridos experimentales por bloque (BBD=15 con 2 puntos centrales, CCD=15 con un solo punto central y DFC= 30 corridos), y ser el más aplicable conforme a los rangos experimentales estipulados para cada variable. En la

Tabla 6 se muestran los 30 corridos realizados, especificando en cada uno el valor de cada variable y las respuestas obtenidas.

Tabla 6. Variables involucradas en el BBD con sus respectivas respuestas obtenidas para cada biflavonoide

| Bloque | Corrido | T. extracción (min) | Contenido de agua (%) | Relación v/m (mL/g) | Respuestas (mg/g muestra seca) | | | |
|--------|------------------|---------------------|-----------------------|---------------------|--------------------------------|------|-----|-----|
| | | | | | Fu | Mo | Vo | Am |
| 1 | 1 ^{pc} | 40 | 25 | 10 | 43,7 | 16,7 | 4,3 | 1,9 |
| 1 | 2 | 5 | 25 | 15 | 37,8 | 13,8 | 3,5 | 0,7 |
| 1 | 3 | 40 | 45 | 15 | 43,1 | 15,4 | 4,0 | 1,6 |
| 1 | 4 | 75 | 25 | 15 | 45,4 | 17,1 | 4,4 | 2,5 |
| 1 | 5 | 5 | 25 | 5 | 34,3 | 13,8 | 3,6 | 0,9 |
| 1 | 6 | 75 | 5 | 10 | 30,1 | 14,6 | 3,9 | 2,2 |
| 1 | 7 | 40 | 45 | 5 | 39,8 | 15,6 | 4,1 | 1,6 |
| 1 | 8 ^{pc} | 40 | 25 | 10 | 47,1 | 18,6 | 4,7 | 2,6 |
| 1 | 9 ^{pc} | 40 | 25 | 10 | 44,4 | 17,7 | 4,5 | 2,0 |
| 1 | 10 | 40 | 5 | 5 | 25,7 | 11,8 | 3,3 | 1,6 |
| 1 | 11 | 75 | 25 | 5 | 38,6 | 14,9 | 4,0 | 2,3 |
| 1 | 12 | 5 | 45 | 10 | 40,1 | 15,4 | 3,9 | 0,8 |
| 1 | 13 | 40 | 5 | 15 | 36,0 | 15,8 | 4,2 | 2,3 |
| 1 | 14 | 5 | 5 | 10 | 21,5 | 8,9 | 2,7 | 0,8 |
| 1 | 15 | 75 | 45 | 10 | 41,6 | 16,2 | 4,3 | 2,3 |
| 2 | 16 ^{pc} | 40 | 25 | 10 | 48,5 | 19,3 | 4,8 | 2,7 |
| 2 | 17 | 5 | 25 | 15 | 44,7 | 16,7 | 4,1 | 0,9 |
| 2 | 18 | 40 | 45 | 15 | 44,4 | 15,6 | 4,0 | 1,7 |
| 2 | 19 | 75 | 25 | 15 | 46,4 | 18,4 | 4,6 | 2,8 |
| 2 | 20 | 5 | 25 | 5 | 34,7 | 13,6 | 3,6 | 0,9 |
| 2 | 21 | 75 | 5 | 10 | 32,0 | 14,7 | 4,0 | 2,2 |
| 2 | 22 | 40 | 45 | 5 | 38,5 | 15,0 | 3,9 | 1,5 |
| 2 | 23 ^{pc} | 40 | 25 | 10 | 49,9 | 19,4 | 4,9 | 2,7 |
| 2 | 24 ^{pc} | 40 | 25 | 10 | 46,2 | 18,7 | 4,7 | 2,3 |
| 2 | 25 | 40 | 5 | 5 | 26,0 | 11,7 | 3,3 | 1,7 |
| 2 | 26 | 75 | 25 | 5 | 43,7 | 17,1 | 4,4 | 2,6 |
| 2 | 27 | 5 | 45 | 10 | 39,9 | 14,7 | 3,7 | 0,8 |
| 2 | 28 | 40 | 5 | 15 | 37,3 | 15,8 | 4,2 | 2,3 |
| 2 | 29 | 5 | 5 | 10 | 22,0 | 9,0 | 2,7 | 0,9 |
| 2 | 30 | 75 | 45 | 10 | 43,6 | 17,0 | 4,4 | 2,4 |

^{pc} Puntos centrales

Por otra parte, los valores predichos de cada una de las respuestas fueron obtenidos a partir de un modelo polinomial de segundo orden (Ecuación 4), ajustando los datos experimentales con las siguientes ecuaciones de regresión:

$$Fu \left(\frac{mg}{g} \right) = -3.3597 + 0.4787X_1 + 1.6362X_2 + 2.4459X_3 - 0.0034X_1^2 - 0.0237X_1X_2 - 0.0214X_2^2 - 0.0157X_2X_3 - 0.0689X_3^2 \quad (Ecuación 5)$$

$$Mo \left(\frac{mg}{g} \right) = -1.5468 + 0.1941X_1 + 0.5839X_2 + 1.2167X_3 - 0.00144X_1^2 - 0.0015X_1X_2 - 0.0071X_2^2 - 0.0098X_2X_3 - 0.0392X_3^2 \quad (Ecuación 6)$$

$$Vo \left(\frac{mg}{g} \right) = 0.4158 + 0.0444X_1 + 0.1157X_2 + 0.2718X_3 - 0.0003X_1^2 - 0.0002X_1X_2 - 0.0014X_2^2 - 0.0024X_2X_3 - 0.0089X_3^2 \quad (\text{Ecuación 7})$$

$$Am \left(\frac{mg}{g} \right) = -1.0623 + 0.0519X_1 + 0.0588X_2 + 0.2305X_3 - 0.0004X_1^2 - 0.0009X_2^2 - 0.0017X_2X_3 - 0.0083X_3^2 \quad (\text{Ecuación 8})$$

Tabla 7. Análisis de varianza de los resultados experimentales obtenidos con el BBD para cada uno de los biflavonoides

| Variable | Mo | | | Fu | | | Vo | | | Am | | |
|-------------------------------|-------|------|---------|--------|------|---------|------|------|---------|------|------|---------|
| | S,C | GI | Valor-P | S,C | GI | Valor-P | S,C | GI | Valor-P | S,C | GI | Valor-P |
| X ₁ | 36,4 | 1,0 | 0,000 | 134,6 | 1,0 | 0,000 | 2,5 | 1,0 | 0,000 | 9,9 | 1,0 | 0,000 |
| X ₂ | 32,1 | 1,0 | 0,000 | 629,3 | 1,0 | 0,000 | 1,0 | 1,0 | 0,000 | 0,1 | 1,0 | 0,185 |
| X ₃ | 14,3 | 1,0 | 0,001 | 182,2 | 1,0 | 0,000 | 0,5 | 1,0 | 0,005 | 0,2 | 1,0 | 0,058 |
| X ₁ ² | 22,6 | 1,0 | 0,000 | 131,6 | 1,0 | 0,000 | 1,2 | 1,0 | 0,000 | 1,5 | 1,0 | 0,000 |
| X ₁ X ₂ | 8,5 | 1,0 | 0,006 | 22,1 | 1,0 | 0,025 | 0,3 | 1,0 | 0,027 | 0,0 | 1,0 | 0,518 |
| X ₁ X ₃ | 0,0 | 1,0 | 0,898 | 1,9 | 1,0 | 0,479 | 0,0 | 1,0 | 0,801 | 0,1 | 1,0 | 0,326 |
| X ₂ ² | 60,1 | 1,0 | 0,000 | 542,0 | 1,0 | 0,000 | 2,3 | 1,0 | 0,000 | 1,0 | 1,0 | 0,000 |
| X ₂ X ₃ | 7,6 | 1,0 | 0,008 | 19,7 | 1,0 | 0,033 | 0,5 | 1,0 | 0,005 | 0,2 | 1,0 | 0,044 |
| X ₃ ² | 7,1 | 1,0 | 0,010 | 21,9 | 1,0 | 0,026 | 0,4 | 1,0 | 0,010 | 0,3 | 1,0 | 0,018 |
| Bloques | 3,7 | 1,0 | 0,055 | 27,6 | 1,0 | 0,014 | 0,2 | 1,0 | 0,073 | 0,2 | 1,0 | 0,065 |
| Error total | 17,6 | 20,0 | | 71,0 | 19,0 | | 0,9 | 19,0 | | 0,9 | 19,0 | |
| Total | 200,8 | 29,0 | | 1729,6 | 29,0 | | 9,1 | 29,0 | | 14,0 | 29,0 | |
| R ² (%) | 91,3 | | | 95,8 | | | 90,5 | | | 93,0 | | |

La significancia de cada coeficiente (β) asociado a las variables lineales, cuadráticas o producto de la interacción de dos variables (Ecuación 5, 6, 7 y 8) fueron evaluadas de acuerdo a un análisis de varianza (ANOVA). El valor-p se tomó como indicativo de la significancia de cada coeficiente y su resultado refleja la fuerza de interacción que ejerce cada variable independiente sobre el valor de las respuestas obtenidas. De acuerdo a los resultados del ANOVA (Tabla 7), para las respuestas Fu, Mo, y Vo únicamente la variable correspondiente a la interacción entre X₁X₃, no fue significativa presentando un valor-p > 0.05. Razón por la cual fue sustraída de la ecuación de regresión de cada uno de los compuestos (Ecuación 5, 6 y 7), en procura de mejorar el ajuste de los datos y por tanto el poder predictivo del modelo. Con respecto a Am, el número de variables no significativas aumentó considerablemente (X₂, X₃, X₁X₂ y X₁X₃). Por lo tanto, esto sugiere que los rangos establecidos para cada variable independiente del BBD, en el caso de Am no confirieron la variabilidad necesaria en la respuesta obtenida de cada corrido ejecutado, como sí ocurrió con Fu, Mo y Vo (Tabla 6). Por lo tanto, en orden de obtener un modelo de regresión más robusto para Am, sin sacrificar las variables lineales, se optó por suprimir las variables X₁X₂ y X₁X₃ del modelo general (Ecuación 8)

Como producto de la representación gráfica de las respectivas ecuaciones de regresión (Ecuación 5, 6, 7 y 8), se obtuvieron los gráficos combinados de superficie de respuesta con contornos para cada biflavonoide (Figura 18).

De forma general, los compuestos Mo y Vo presentaron un comportamiento similar en los tres factores evaluados. Las variables X_1 y X_2 presentaron un efecto cuadrático predominante, reflejado en un aumento, posterior estabilización y finalmente una disminución de la respuesta a través del rango evaluado. En términos del tiempo, la extracción de Mo y Vo se incrementó de forma significativa durante los primeros 30 minutos, periodo en donde se produce la mayor difusión sólido-líquido de los biflavonoides más asequibles. Hasta los 60 minutos aproximadamente, se produce un aumento menos pronunciado en la extracción de estos compuestos relacionado posiblemente con la disminución de la concentración de los biflavonoides en la matriz sólida y la saturación del solvente de extracción. Seguido de los 60 minutos, los cambios encontrados son prácticamente insignificantes, entrando en un estado de estabilización y posterior decaimiento de la respuesta a causa de una leve degradación de los analitos. Frente al % de agua, en el rango evaluado, si se presentaron variaciones más relevantes en comparación con el tiempo de extracción. En términos de la constante dieléctrica del solvente empleado, el aumento de dicha constante a causa de la adición de agua hasta un 20 % favorece de forma significativa la cantidad extraída de Mo y Vo. En el rango entre 20 y 30 % de agua se alcanzan las mayores respuestas y una vez se aumenta el contenido de agua por encima del 30%, la eficiencia disminuye significativamente a causa de un aumento excesivo de la polaridad del solvente desfavoreciendo la difusión y la solubilidad de los biflavonoides. De forma conjunta las zonas de máxima respuesta se alcanzaron para ambos compuestos en un rango entre el 20 y el 30% de agua en el solvente y a un tiempo de extracción entre 50 y 70 minutos (Figura 18- A1, C1). En lo concerniente al Fu (Figura 18- B1-3), el tiempo de extracción no fue tan relevante, presentando un rango más amplio (30 a 75 minutos). Frente al % de agua, la zona de máxima respuesta se vio ligeramente aumentada (25 a 35% agua), debido principalmente a que el Fu es el glicósido de la Mo, lo que repercute en una mayor polaridad y afinidad por el agua. Caso contrario ocurrió con Am, la cual al ser el compuesto más apolar, de acuerdo a los gráficos de superficie de respuesta (Figura 18- D1-3), fue el compuesto que requirió un mayor tiempo de extracción (65-75 minutos) y un menor % de agua (15-25%). En cuanto a la relación volumen/masa (X_3), en los cuatro compuestos se alcanzaron los máximos de respuesta después de 10 mL/g. Un valor inferior sugiere que la capacidad de difusión de la muestra del solvente no es la adecuada en conjunto con una saturación temprana impidiendo de esta forma la solubilidad de los biflavonoides.

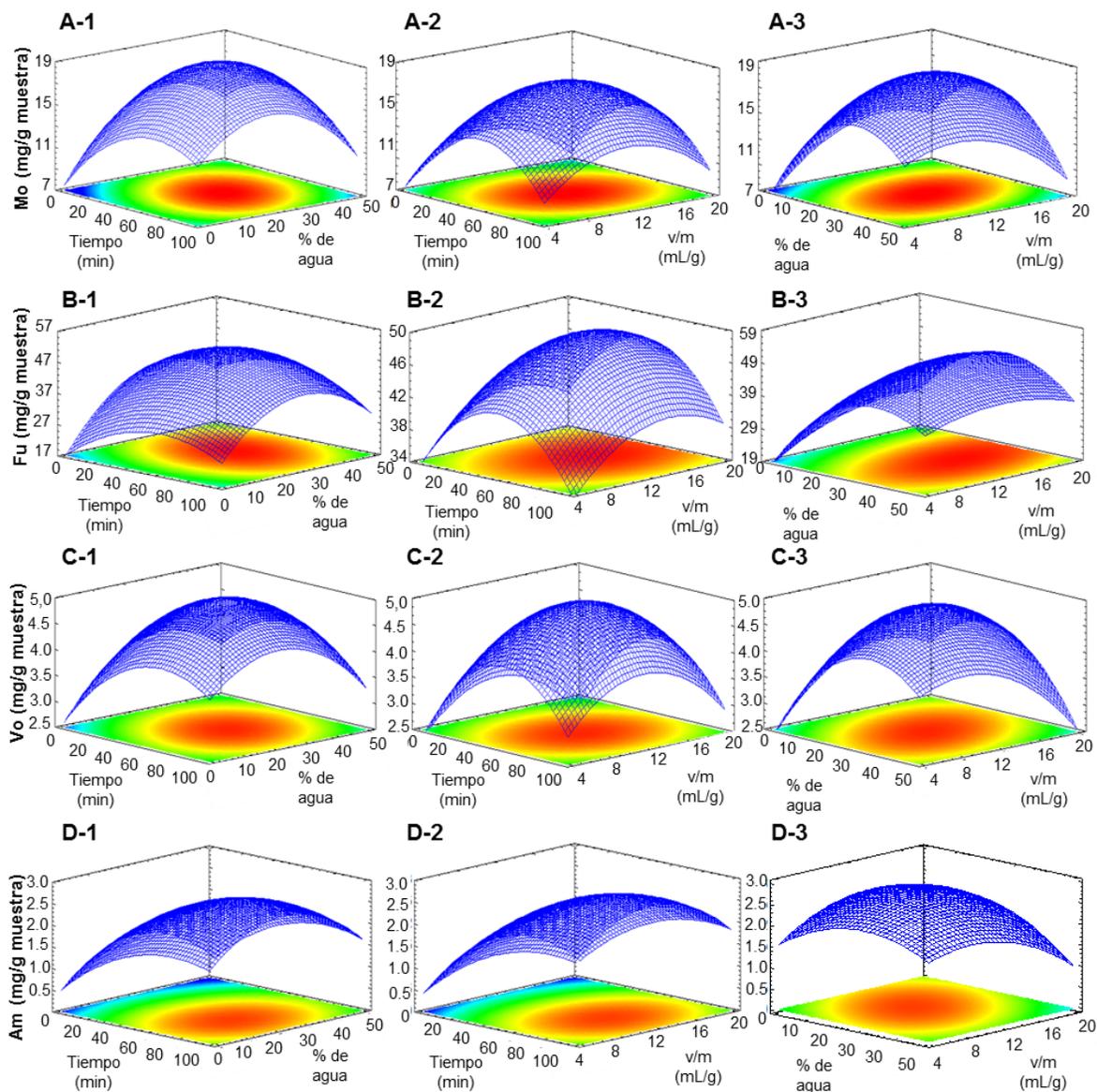


Figura 18. Gráficos de superficie de respuesta y contornos. Efecto del tiempo de extracción (X_1), % de agua (X_2) y relación líquido/sólido (X_3) en la extracción de Mo (A1-A3), Fu (B1-B3), Vo (C1-C3) y Am (D1-D3).

Las condiciones óptimas de extracción para cada compuesto, fueron obtenidas resolviendo cada una de las ecuaciones de regresión, siendo $X_1=50.24$; $X_2= 30.17$ y $X_3= 14.30$ para Fu; $X_1=54.05$; $X_2= 27.02$ y $X_3= 12.10$ para Mo; $X_1=56.13$; $X_2=26.38$ y $X_3= 11.74$ para Vo; y $X_1=70.41$; $X_2= 21.43$ y $X_3= 11.68$ para Am. bajo estas condiciones, se obtuvieron las siguientes respuestas predichas por el modelo: 49.32, 18.99, 4.79 y 2.74 mg/g de Fu, Mo, Vo y Am, respectivamente. Con el fin de obtener una única metodología aplicable para los cuatro analitos, fue necesario seleccionar unas condiciones generales de extracción que no

comprometieran significativamente la cantidad extraída de cada uno de ellos. Las condiciones finales establecidas teniendo en cuenta la importancia biológica y el contenido de cada biflavonoide, fueron: $X_1=$ 58 minutos de extracción por sonicación; $X_2=$ Solvente de extracción etanol/ agua en una proporción 74:26; y $X_3=$ una relación volumen/masa de 13 ml de solvente por gramo de muestra. Bajo estas condiciones, los valores de respuesta predichos por el modelo de regresión fueron: 48.62, 18.95, 4.77 y 2.64 mg/g para Fu, Mo, Vo y Am, respectivamente. Las condiciones finales fueron evaluadas experimentalmente por triplicado obteniendo como respuesta promedio: 48.53, 19.18, 4.86 y 2.91 mg/g de Fu, Mo, Vo y Am, respectivamente. De esta forma comparando los valores predichos con los experimentales, únicamente existe un error relativo de 0.68 % en el contenido total de biflavonoides obtenido, confirmando así, que el modelo de regresión planteado es adecuado para la optimización de la extracción de biflavonoides de *G. madruno*.

5.2.3 Purificación de los extractos

Teniendo establecidas las condiciones que favorecen e incrementan la extracción de los biflavonoides desde su matriz sólida al solvente de extracción utilizado, como paso siguiente en la obtención de extractos enriquecidos con estos compuestos, se plantearon dos nuevos abordajes metodológicos. Si bien, está comprobado que la EAU es una técnica eficiente para la extracción de compuestos fenólicos, una particularidad es que esta no se caracteriza por ser totalmente selectiva. La selectividad del proceso se atribuye principalmente a las características del solvente de extracción utilizado. De esta forma, con el solvente Etanol/agua en una proporción 74:26, además de los biflavonoides, seguramente otros constituyentes son igualmente extraídos, aportando masa y diluyendo el extracto final obtenido. Frente a *G. madruno* no existe mucha información que revele el contenido de carbohidratos, proteínas, lípidos, clorofilas y otros fitoquímicos en las diferentes partes de la planta, por lo tanto, teniendo presente que los biflavonoides tienen una polaridad intermedia, se plantearon dos abordajes metodológicos independientes para la eliminación de compuestos polares y apolares que abarcará la eliminación de la mayor cantidad de compuestos diferentes a los biflavonoides.

Para la eliminación de los compuestos apolares se seleccionó como punto de partida la matriz hojas, tomando a las clorofilas como compuestos referentes a eliminar. La Figura 19 muestra el efecto que tiene la adición de agua sobre los extractos líquidos en la precipitación de compuestos apolares y la subsecuente concentración de los biflavonoides en estos. Como variable independiente se empleó diferentes porcentajes de agua y como respuestas el contenido de los biflavonoides (Mo, Vo, Fu y Am) por gramos de extracto y la masa del extracto seco obtenido. Como se observa en la Figura 19-A, B y C, el contenido de Mo, Fu y Vo aumentó conforme se incrementó el % de agua agregado, alcanzando un máximo valor a un 150%. Posterior a este valor se aprecia una caída abrupta en la concentración

de estos compuestos. De esta forma se da por entendido que hasta un 150 % de agua agregada la relación de compuestos apolares versus biflavonoides precipitados favorece la concentración de los biflavonoides en los extractos secos, a razón de una mayor precipitación de los compuestos más apolares como clorofilas, lípidos, entre otros. Este resultado se correlacionó con el comportamiento encontrado en la Figura 19-E, obteniendo así, la menor masa de extracto a un 150 % de agua agregada.

Con respecto a Am (Figura 19-D), la máxima concentración se alcanzó con 100 % de agua. En relación con los otros biflavonoides, era de esperarse este resultado, ya que Am es el biflavonoide más apolar, siendo así el más propenso a precipitarse conforme se aumentaba la polaridad del solvente. En orden de escoger unas condiciones generales para el “clean up” de compuestos apolares en las diferentes matrices del madroño, se escogió 100% de agua como la condición más apropiada basado en tres aspectos principales: i) favorecer la solubilidad de la Am; ii) otorgar un rango de variabilidad más amplio evitando la posible precipitación de biflavonoides en matrices con mayor contenido de estos compuestos, tal es el caso del epicarpio; y iii) la falta de diferencias significativas ($p > 0.05$) en el contenido de biflavonoides (Mo y Vo) obtenidos entre 100 y 150% de agua agregada. De esta forma empleando una metodología simple, económica, carente de solventes orgánicos y sin la necesidad de emplear separaciones cromatográficas, se logró eliminar una serie de compuestos apolares, incrementando en alrededor de un 25% el contenido de biflavonoides totales en los extractos de hojas obtenidos.

Mediante la realización de ensayos preliminares con las 5 matrices de análisis, los extractos secos obtenidos a partir del epicarpio y mesocarpio empleando la metodología de extracción optimizada en conjunto con el proceso de clean up de compuestos apolares, no presentaron un aumento considerable en el contenido de biflavonoides (datos nos mostrados). Si bien, solo existe un reporte del contenido de metabolitos primarios en el fruto del madroño, en donde se estima que alrededor de un 94% del peso seco del mesocarpio corresponde a carbohidratos [109], es ampliamente conocido, que los frutos carnosos, tanto a nivel del mesocarpio como el epicarpio están relacionados con altos contenidos de monosacáridos, polisacáridos, pectinas, fibras, entre otros compuestos de características polares. Por lo tanto, en estas matrices, un clean up dirigido a compuestos apolares, no representaría la estrategia más efectiva para aumentar el contenido de biflavonoides.

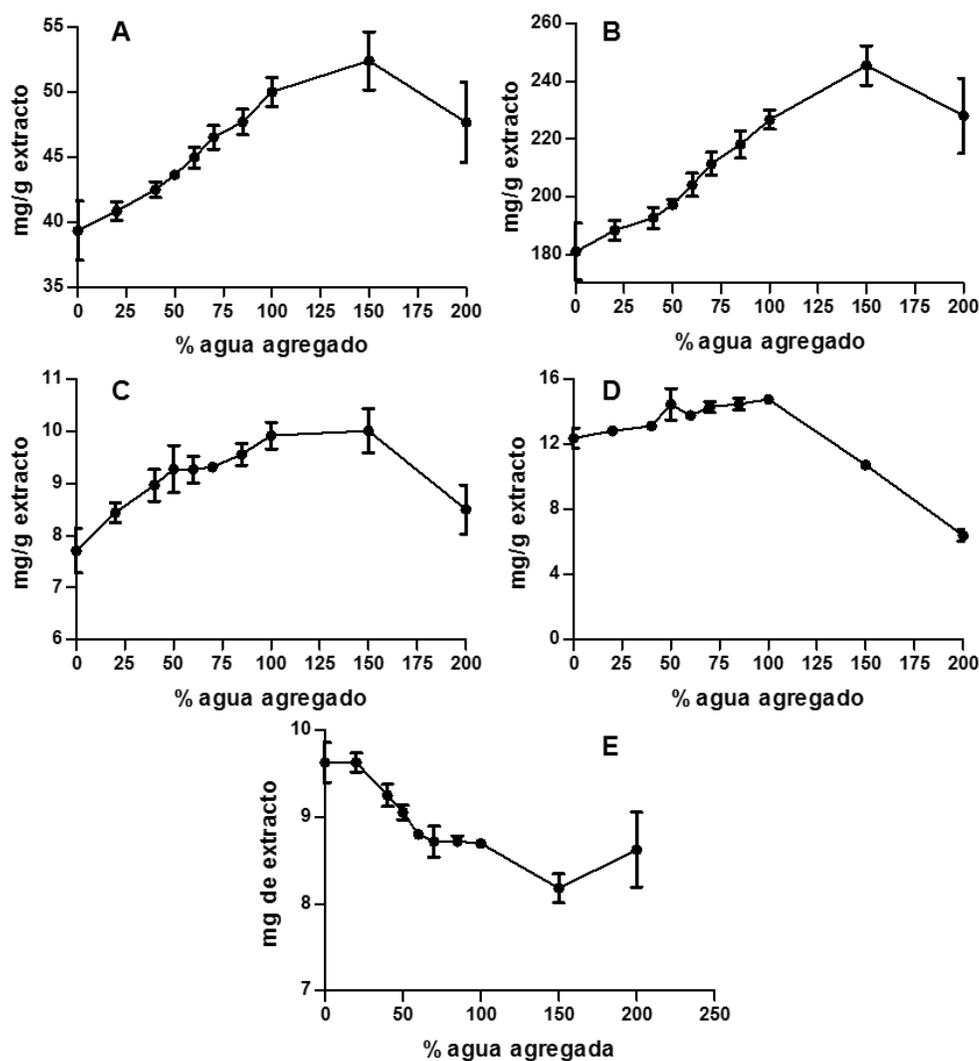


Figura 19. Efecto del Clean up de compuestos apolares sobre la concentración de biflavonoides en los extractos. Contenido de Mo (A), Fu (B), Vo (C) y Am (D) en extractos de hojas de *G. madruno* (mg/g extracto) a diferentes proporciones de agua adicionada. D) masa de extracto obtenida a las respectivas proporciones de agua adicionada. Para mayor comprensión de la metodología empleada ver el numeral 5.1.2.1.

De esta forma se planteó realizar un nuevo proceso de clean up, empleando un nuevo BBD con el epicarpio como matriz de referencia (numeral 5.1.2.2). Esto con el objetivo de obtener extractos más concentrados en términos del contenido de biflavonoides, a consta de la eliminación directa de compuestos polares abundantes en estas matrices. En la actualidad son diversos los métodos empleados para la extracción de carbohidratos y otros compuestos polares comúnmente presentes en frutos [212,213]. En particular, estos métodos se caracterizan por emplear como solvente agua acidulada, empleando metodologías de extracción ya sea convencionales, mediadas por altas temperaturas o EAU. Entre los

acidulantes más empleados y más efectivos se encuentran los ácidos inorgánicos como el ácido nítrico, clorhídrico o sulfúrico [214]. Sin embargo, en lo concerniente a este trabajo, se decidió emplear un ácido orgánico como lo es el ácido cítrico, dado que este es un compuesto natural, considerado como un ingrediente seguro en la industria alimentaria y ampliamente utilizado en la extracción de pectinas grado alimentario y farmacéutico [215–217].

Tabla 8. Variables involucradas en el BBD del clean up de compuestos polares con sus respectivas respuestas obtenidas

| Corrido | Tiempo (min) | pH | Temperatura (°C) | BF totales (mg/g extracto) | peso extracto (mg) | BF perdidos (mg/g) |
|---------|--------------|-----|------------------|----------------------------|--------------------|--------------------|
| 1 | 10 | 3,5 | 25 | 523,1 | 8,6 | 2,4 |
| 2 | 5 | 2 | 25 | 375,8 | 12,9 | 4,2 |
| 3 | 0 | 5 | 40 | 504,7 | 8,5 | 1,8 |
| 4 | 5 | 3,5 | 40 | 512,7 | 8,4 | 1,8 |
| 5 | 5 | 5 | 25 | 532,3 | 8,1 | 1,6 |
| 6 | 10 | 3,5 | 55 | 493,0 | 8,8 | 2,6 |
| 7 | 0 | 3,5 | 55 | 508,3 | 8,6 | 1,6 |
| 8 | 0 | 3,5 | 25 | 522,3 | 7,1 | 3,3 |
| 9 | 10 | 2 | 40 | 350,0 | 13,7 | 3,3 |
| 10 | 0 | 2 | 40 | 341,8 | 13,3 | 3,9 |
| 11 | 5 | 3,5 | 40 | 492,6 | 8,6 | 1,6 |
| 12 | 5 | 3,5 | 40 | 439,3 | 10,5 | 1,4 |
| 13 | 10 | 5 | 40 | 541,7 | 8,4 | 1,3 |
| 14 | 5 | 2 | 55 | 347,4 | 13,0 | 4,8 |
| 15 | 5 | 5 | 55 | 526,3 | 8,5 | 2,5 |

Como resultado del diseño empleado, en la Tabla 8 se muestran las respuestas obtenidas en cada uno de los corridos ejecutados y en la Figura 20, de forma gráfica, se resumen las principales superficies de respuesta en conjunto con los diagramas de Pareto. Como se evidencia para todas las respuestas, de acuerdo a un ANOVA (datos no mostrados) y a los diagramas de Pareto (Figura 20 A, C y E), las variables independientes tiempo de extracción (X_1), temperatura de extracción (X_2) y sus respectivas variables cuadráticas y productos entre las variables no fueron significativas ($p > 0.05$). Únicamente el factor pH (X_2) con su respectivo comportamiento cuadrático (X_2^2) fueron las variables influyentes en las tres respuestas evaluadas. Con respecto a los gráficos de superficies de respuesta en un rango de pH entre 4 y 5 se observan las mejores respuestas alcanzando: i) el mayor contenido de biflavonoides totales por gramo de extracto obtenido (Figura 20-B); ii) la menor pérdida de biflavonoides por gramos de muestra presentada en el proceso de extracción con el ácido cítrico (Figura 20-D) y iii) el menor rendimiento de extracto, el cual se relaciona con una mayor pérdida de compuestos diferentes a los biflavonoide (Figura 20-F). Resolviendo cada una de las ecuaciones de regresión (ecuaciones no mostradas), los valores óptimos de pH

obtenidos fueron 4.7, 4.4 y 4.4 para las respuestas y_1 , y_2 y y_3 respectivamente. De forma práctica se optó por utilizar un valor promedio (4.5) representativo para las tres respuestas, toda vez que las variables X_1 y X_2 no fueron significativas. Como valores óptimos se seleccionaron aquellos que implicarán la menor intervención posible, promoviendo de esta forma: una mayor simplicidad del método, la disminución del tiempo del proceso y la disminución del gasto energético. Por tanto como metodología general para el clean up de compuestos polares se empleó los siguientes valores para cada factor: tiempo de extracción- X_1 (0 minutos), pH regulado con ácido cítrico- X_2 (4.5) y temperatura de extracción X_3 (ambiente).

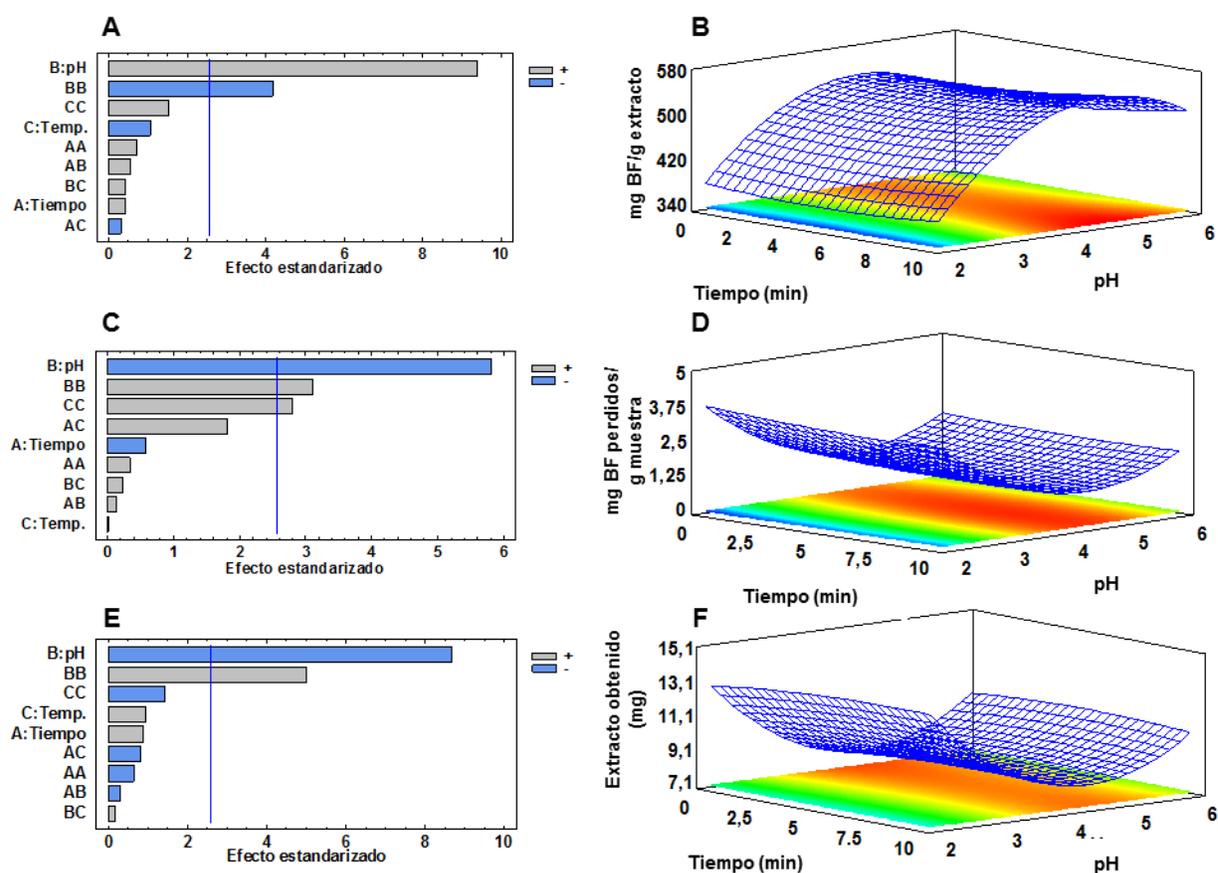


Figura 20. Gráficos de superficies de respuesta y de Pareto para cada una de las respuestas evaluadas en el BBD del clean up de compuestos polares. Para mayor comprensión de la metodología empleada ver el numeral 5.1.2.2

5.2.4 Extractos obtenidos

Finalmente empleando la metodología completa de extracción (Figura 21), se obtuvieron los extractos ricos en biflavonoides para cada una de las matrices del madroño.

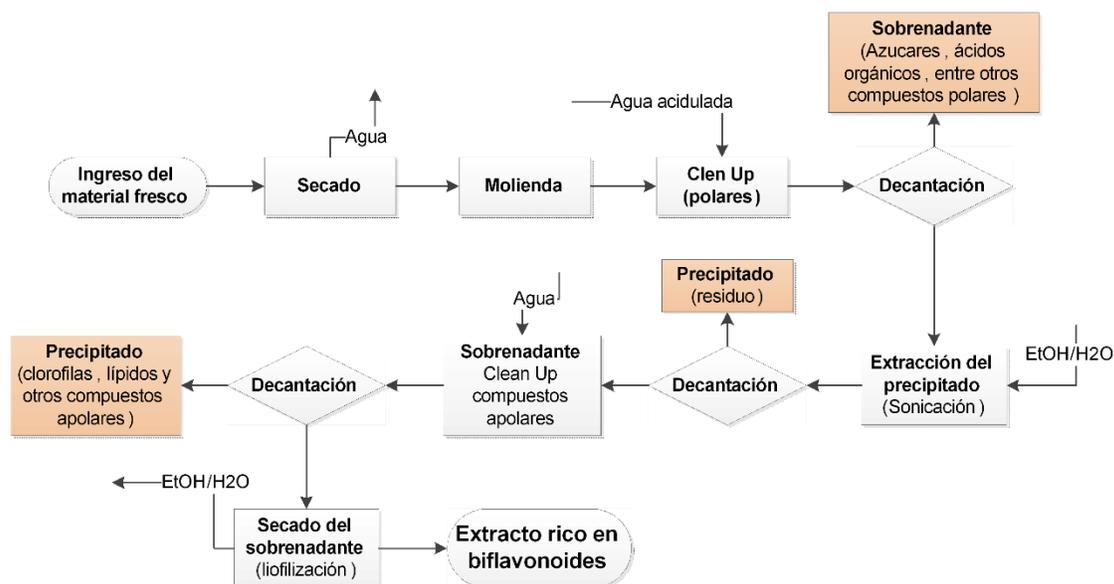


Figura 21. Esquema del procesos empleado en la obtención de extractos con alto contenido de biflavonoides a partir de *G. madruno*.

En la Tabla 9 se compara el contenido de biflavonoides presente entre cada matriz de análisis “materia prima” y sus respectivos extractos optimizados. En comparación con los resultados obtenidos en las matrices (Tabla 9 y Figura 16), los extractos optimizados se caracterizaron por presentar cantidades superiores de Mo respecto a Fu. Únicamente en las hojas, la relación de estos compuestos se mantuvo constante. Esto podría estar relacionado con un proceso de interconversión de Fu a Mo principalmente durante la primera extracción correspondiente al proceso de clean up de compuestos polares. El proceso podría estar mediado por la activación enzimática de glucosidasas endógenas presentes en las respectivas matrices al interactuar con el agua adicionada. Si bien no se conocen reportes sobre la presencia de β -glucosidasas en *G. madruno*, existen diversos reportes en donde estas enzimas tienen la capacidad de alterar el perfil de compuestos fenólicos hidrolizando principalmente los glicósidos en sus respectivas agliconas en procesos de secado y extracción principalmente [218–220]. Adicionalmente, no es probable atribuir este cambio en la concentración de Fu a una pérdida considerable de este compuesto en el respectivo clean up, ya que tal como se muestra en Figura 20-D, la pérdida de biflavonoides en la extracción con ácido cítrico no es significativa. Además con respecto

a Vo y en especial en las semillas se observa un aumento de 23 veces en el contenido de este compuesto entre la matriz y su respectivo extracto, lo cual podría estar muy relacionado con la hidrólisis del Es (glicósido de Vo).

Tabla 9. Contenido de biflavonoides en matrices y extractos de *G. madroño*

| Matriz | Contenido de biflavonoides (mg/g)* | | | | | Rendimiento (%) |
|------------------------------|------------------------------------|---------------|--------------|--------------|----------------|-----------------|
| | Mo | Fu | Vo | Am | Total BF (%) | |
| Hojas | 26,02 ± 1,05 | 35,05 ± 0,81 | 3,63 ± 0,17 | 2,26 ± 0,10 | 66,96 (6,70) | -- |
| Tallos | 33,49 ± 1,06 | 6,73 ± 0,29 | 2,83 ± 0,13 | 0,88 ± 0,04 | 43,93 (4,39) | -- |
| Epicarpio | 94,02 ± 4,99 | 13,90 ± 0,69 | 5,83 ± 0,31 | ND | 113,75 (11,37) | -- |
| Mesocarpio | 1,67 ± 0,14 | < LLOQ | 0,12 ± 0,01 | ND | 1,79 (0,18) | -- |
| Semillas | 6,64 ± 0,05 | 8,40 ± 0,40 | 1,26 ± 0,01 | ND | 16,29 (1,63) | -- |
| Extractos optimizados | | | | | | |
| Hojas | 128,47 ± 4,43 | 170,79 ± 3,85 | 16,66 ± 0,70 | 11,13 ± 0,87 | 327,05 (32,71) | 13,22 ± 0,80 |
| Tallos | 250,54 ± 3,79 | 19,16 ± 0,44 | 20,10 ± 0,37 | 5,12 ± 0,26 | 294,92 (29,49) | 10,17 ± 0,32 |
| Epicarpio | 404,95 ± 23,72 | 39,84 ± 2,44 | 26,97 ± 2,79 | ND | 471,76 (47,18) | 18,02 ± 0,12 |
| Mesocarpio | 22,884 ± 0,90 | 0,758 ± 0,01 | 1,805 ± 0,09 | ND | 25,45 (2,54) | 10,10 ± 0,54 |
| Semillas | 165,40 ± 4,57 | 35,41 ± 3,62 | 29,99 ± 0,92 | ND | 230,80(23,08) | 6,13 ± 0,17 |

* De acuerdo a un análisis de varianza (ANOVA) existe una diferencia significativa ($p < 0.05$) entre el contenido de cada biflavonoide en las diferentes matrices y extractos, así como en el porcentaje total de biflavonoides.

De forma general se establece que el proceso de extracción empleado (Figura 21) fue bastante eficiente. En orden descendente las matrices más favorecidas fueron Semillas> Mesocarpio> Tallos> Hojas> Epicarpio, aumentando el contenido de biflavonoides totales en 15.6, 14.1, 6.7, 4.9 y 4.1 veces, respectivamente. Sin embargo, sin duda alguna las hojas y el epicarpio continúan siendo las matrices más relevantes alcanzando un porcentaje total de biflavonoides del 47.18 y 32.71% respectivamente, siendo la Mo el compuesto más representativo, con cerca de 40% del contenido en el extracto optimizado de epicarpio. De esta forma se plantean como las matrices más susceptibles para su escalado y como fuentes representativas para la producción de ingredientes a base de biflavonoides del madroño.

Por otra parte, la eficiencia de la extracción estuvo correlacionada de forma inversa con el rendimiento de la extracción, indicando que a menor rendimiento mayor la eficiencia en los respectivos procesos de clean up y por consiguiente una mayor eliminación de compuestos diferentes a los biflavonoides. En adición, los resultados encontrados se relacionan con la probable composición de las diferentes matrices. En el caso de las semillas, éstas están relacionadas con altos contenidos de lípidos, por tanto el clean up para compuestos apolares permitió la eliminación de forma significativa de estos compuestos alcanzando así la mayor eficiencia en la extracción. Por su parte, tal como se había mencionado

anteriormente, el mesocarpio del madroño contiene cerca de un 94 % de azúcar, razón por la cual, el empleo del clean up para compuestos polares principalmente, permitió el aumento considerable en el contenido de biflavonoides en el extracto obtenido.

Finalmente, el método de extracción planteado consiste en una aproximación sencilla, eficiente, amigable con el medio ambiente, factible al escaldo y confiable para la obtención de extractos de alta calidad obtenidos a partir de *G. madruno*. Por lo cual, se establece de esta forma como el punto de partida para el desarrollo de productos de valor, en vista de las potencialidades encontradas hasta el momento de los biflavonoides en la prevención y tratamiento de algunas de las ENT.

6 ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE DE BIFLAVONOIDES DE GARCINIA MADRUNO

6.1 MATERIALES Y MÉTODOS

La actividad antioxidante de las matrices y extractos optimizados de *G. madruno*, estándares de biflavonoides y flavonoides estructuralmente relacionados, se evaluó por las metodologías de ORAC, FRAP y TPC, esta última como una medida cuantitativa indirecta del contenido total de compuestos de tipo fenólico. A nivel metodológico, estas pruebas se realizaron conforme a los métodos publicados previamente por el GISB [221] y frente a los procedimientos operativos estándar del mismo laboratorio. Estas metodologías se encuentran totalmente validadas y hacen parte de los servicios de extensión del Grupo de Investigación. Todas las muestras ejecutadas en este trabajo, por cualquiera de esas metodologías, se realizaron con el mismo rigor aplicado a una muestra de análisis externo.

6.1.1 Método ORAC (Oxygen Radical Absorbance Capacity)

De forma general, las muestras de análisis se diluyeron en buffer fosfato (pH: 7.4). Como estándar se utilizó Trolox (12.5-200 μM). En un microplato negro de 96 pozos se agregaron en el siguiente orden: la muestra o estándar y la fluoresceína (1.6 μM) en una proporción de 1:3, respectivamente. La solución generada se incubó durante 30 min a 37°C directamente en el equipo. Transcurrido este tiempo se adicionó una solución de AAPH 125 mM en PBS a la solución incubada, en una relación 1:4. La intensidad de la fluoresceína se midió cada minuto durante 120 minutos a longitudes de onda de excitación y emisión de 485 y 520 nm respectivamente, en un lector de platos multimodal (BIOTEK HT SINERGY). La curva de calibración se construyó con el área bajo la curva neta (ABC neto) de cada una de las concentraciones de trolox empleadas en los diferentes niveles de calibración. Las muestras fueron evaluadas por cuadruplicado y los resultados fueron expresados como μmol equivalentes de Trolox por cada 100 g de muestra acorde al factor de cálculo empleado en la ecuación 9.

$$\frac{\mu\text{Mol Trolox eq}}{100\text{g muestra}} = \frac{\frac{\mu\text{Mol}}{L} (\text{de la curva}) \times FD \times V (L)}{\text{masa de muestra (g)}} * 100 \quad (\text{Ecuación 9})$$

6.1.2 Método FRAP (Ferric Reducing Antioxidant Power)

Como estándar de referencia se utilizó Trolox en un rango dinámico de 31.25 a 500 μM . La solución de trabajo FRAP se preparó adicionando en el siguiente orden: buffer acetato 300

mM (pH: 3.6), TPTZ 40 mM en HCl y $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 20 mM en agua, en proporciones 10:1:1, respectivamente. Las muestras y las soluciones estándar se evaluaron simultáneamente en un plato de 96 pozos. Se adiciono en cada pozo la muestra o estándar correspondiente en conjunto con la solución de trabajo FRAP en una proporción 1:25, respectivamente. Finalmente el plato se incubo a 37°C durante 10 minutos en la oscuridad y a cada pozo se le registró la absorbancia a 593 nm cada 5 minutos por 30 minutos, en un lector de platos multimodal (BIOTEK HT SINERGY). La curva de calibración se construyó con la absorbancia obtenida a un tiempo de 30 minutos de cada una de las concentraciones de Trolox empleadas en los diferentes niveles de calibración. Las muestras se evaluarán por triplicado y los resultados se expresaron en equivalentes de Trolox por cada 100 g de muestra acorde al factor de cálculo empleado en la ecuación 9.

6.1.3 Evaluación del contenido de polifenoles totales (TPC) mediante el método de Folin-Ciocalteu.

Como estándar de referencia se utilizó el ácido gálico en un rango dinámico de 10 a 100 $\mu\text{g/mL}$. En platos de 96 pozos se agregó en el siguiente orden: la muestra o estándar, el reactivo de Folin-Ciocalteu al 10 % y la solución de carbonato de sodio al 7.5%, en proporciones de 1:5:4 respectivamente. Entre la adición del reactivo de Folin y el carbonato de sodio se dejó un tiempo de 5 minutos. La mezcla final, se agitó en un vortex por 30 segundos y se protegió de la luz, dejando reaccionar por 60 minutos. Una vez transcurrido el tiempo, a cada pozo se le registró la absorbancia a 760 nm en un lector de platos multimodal (BIOTEK HT SINERGY). Las muestras se evaluaron por triplicado y los resultados fueron expresados como equivalentes de ácido gálico por gramo de muestra (GAE/g) acorde al factor de cálculo empleado en la ecuación 1.

6.1.4 Estudio Relación Estructura Actividad-Antioxidante (REA)

Para el estudio de Relación Estructura Actividad Antioxidante (REA-Antioxidante) se emplearon los siguientes compuestos: i) biflavonoides de *G. madruno*: Mo, Vo, Am y Fu; ii) biflavonoides estructuralmente relacionados: biapigenina (BIA) (3→8'' biapigenina); iii) monómeros constitutivos de los biflavonoides: apigenina (Ap), luteolina (Lu), naringenina (Na) y Luteolina-7-O-g (LuG), y iv) otros flavonoides representativos: quercetina (Q) y (+)-catequina (Ca).

La capacidad antioxidante fue medida por las metodologías ORAC y FRAP. Todas las pruebas se realizarán con los 11 compuestos descritos, evaluándose cada uno de estos a la misma concentración molar, 10 μM y 100 μM , para ORAC y FRAP respectivamente.

6.1.5 Análisis estadísticos

Todos los resultados fueron expresados como el promedio de las mediciones \pm la desviación estándar. El coeficiente de correlación de Pearson y los análisis de varianza fueron llevado a cabo por el programa estadístico GraphPadPrism® Versión 5.00 para Windows, (GraphPad software, Inc, San Diego CA 2007).

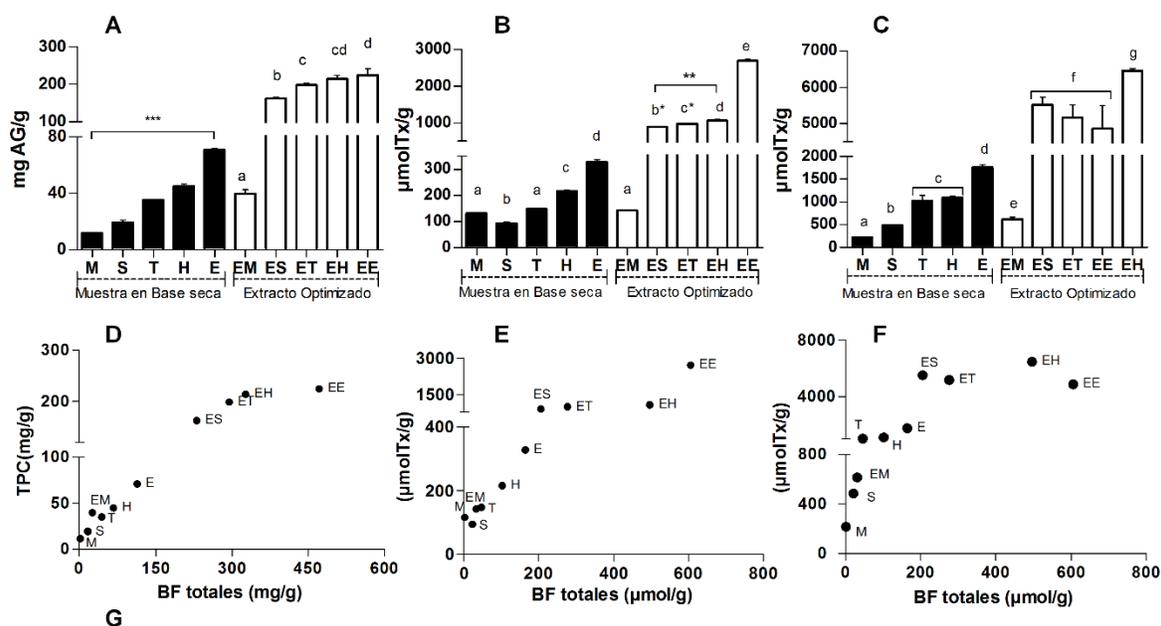
6.2 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

6.2.1 Actividad antioxidante de muestras y extractos

En la Figura 22 se resumen los resultados obtenidos de la actividad antioxidante del material seco (materia prima) de las diferentes partes de *G. madruno* así como la de sus respectivos extractos obtenidos conforme al proceso desarrollado (Figura 21). Es importante mencionar que si bien la determinación del contenido de compuestos fenólicos totales por el método de Folin-Ciocalteu no es una medida directa de la actividad antioxidante, si basa su mecanismo de medición en procesos reductores. Por tanto, fue incluido en esta sesión como medida complementaria de los resultados cuantitativos obtenidos por HPLC-DAD en cada una de las matrices de análisis.

En relación a la evaluación de las matrices en base seca, el contenido de polifenoles totales (Figura 22-A), y la actividad antioxidante evaluada por el método de FRAP (Figura 22-B) y ORAC (Figura 22-C) muestran un resultado semejante, obteniendo el siguiente orden creciente: Mesocarpio (M) < Semillas (S) < Tallos (T) < Hojas (H) y epicarpio (E). Estos resultados se correlacionan con el contenido de biflavonoides obtenido a nivel cromatográfico (Tabla 9). Por otra parte en los extractos optimizados, se evidenció un aumento considerable tanto en el contenido de polifenoles totales como en las pruebas de actividad antioxidante en comparación con las muestras en base seca. Sin embargo la correlación de estos resultados con el contenido de biflavonoides no fue tan significativa, evidenciándose en el comportamiento de los gráficos de correlación respectivos (Figura 22-D, E y F). En todos los casos se observa que a medida que aumenta el contenido de biflavonoides en las diferentes matrices, los valores de actividad antioxidante no incrementan bajo la misma relación observada en las matrices secas. De hecho, respecto al valor ORAC, el extracto de epicarpio (EE) el cual presenta un contenido cercano al 50% de biflavonoides (Tabla 9) fue superado por los valores obtenidos de los extractos de hojas (EH), tallos (ET) y semillas (ES). Este último resultado podría explicarse desde diversos puntos de vista: inicialmente se debe tener presente que el contenido de biflavonoides totales se determina únicamente por los cuatro biflavonoides cuantificados sin tener en cuenta los demás picos identificados como biflavonoides (Figura 14), los cuales de acuerdo

a las respuestas cromatográficas obtenidas, varían considerablemente en todos los extractos optimizados obtenidos. Adicionalmente, otra condición aplicable al EE tiene que ver con las diluciones requeridas. En este caso, éstas fueron superiores a 1/2000, por tanto a nivel analítico es esperable un aumento en la variabilidad y magnificación de los errores sistemáticos del método. Por otro lado, la correlación entre valor ORAC y el contenido de biflavonoides totales supone que todos los biflavonoides de forma individual confieren la misma actividad y tal como se evidencia en la Figura 22-F, los coeficientes de correlación obtenidos para cada biflavonoide difieren de forma considerable, por tanto en conjunto con los resultados expresados en la Figura 25-A, es evidente que la actividad antioxidante evaluada por la metodología ORAC varía de forma considerable entre los diferentes biflavonoides.



| Pruebas | Mo (μmol/g) | Fu (μmol/g) | Vo (μmol/g) | Am (μmol/g) | BF totales (μmol/g) |
|-----------------|-------------|-------------|-------------|-------------|---------------------|
| TPC (mgAG/g) | 0,863*** | 0,812** | 0,853** | 0,534NS | 0,922*** |
| FRAP (μmolTx/g) | 0,539NS | 0,753* | 0,463NS | 0,166NS | 0,920*** |
| ORAC (μmolTx/g) | 0,863*** | 0,792** | 0,930*** | 0,599NS | 0,840** |

Figura 22. Actividad antioxidante de *G. madruno* y estudios de correlación frente al contenido de biflavonoides. Contenido de polifenoles totales (A), valor FRAP (B) y Valor ORAC (C) de cada una de las matrices de *G. madruno* con sus respectivos extractos optimizados. Las figuras D, E y F corresponde a los gráficos de correlación de Pearson entre el contenido de biflavonoides totales (μmol/g) y el contenido de polifenoles totales, la actividad antioxidante evaluada por FRAP y ORAC respectivamente. (F) tabla de coeficientes de correlación de Pearson entre el contenido de biflavonoides y la actividad antioxidante. De acuerdo a un ANOVA columnas con diferentes letras presentan diferencias significativas (valor $p < 0.05$), NS = no significativo; * significativo (valor $p < 0.05$); ** fuertemente significativa (valor $p < 0.01$) y *** altamente significativa (valor $p < 0.001$).

Con el objetivo de contextualizar la magnitud de la actividad antioxidante encontrada en la materia prima y extractos de *G. Madruno*, los valores ORAC obtenidos de las dos matrices más significativas, hojas y epicarpio, fueron contrastados con los datos suministrados en la base de datos del Instituto de Nutrición y Tecnología de Alimentos (INTA) de la Universidad de Chile (www.portalantioxidantes.com) [222]. Para las hojas y el epicarpio los valores ORAC obtenidos en este trabajo fueron de 175.834 y 109.506 $\mu\text{mol Trolox}/100\text{ g}$ de muestra seca, respectivamente. En comparación con la base de datos mencionada, el calafate, una baya que se distribuye en el sur de Chile y Argentina, corresponde a la fruta con un mayor valor ORAC entre 150 frutas analizadas, con un valor de 72.425 $\mu\text{mol Trolox}/100\text{ g}$ de muestra seca [222]. A su vez, si se comparan los valores obtenidos para el madroño con frutas ampliamente distribuidas y conocidas, la diferencia encontrada es más significativa, por ejemplo para el mango, manzana, arándanos y ciruelas, los valores ORAC corresponden a 1.822, 18.982, 34.329 y 52.417 $\mu\text{mol Trolox}/100\text{ g}$ de muestra seca, respectivamente.

Se debe tener en cuenta, sin embargo, que la comparación de estos valores presenta limitaciones y las conjeturas y conclusiones deben hacerse con precaución. De hecho en el 2010 la USDA (United States Department of Agriculture) publicó una base de datos de la actividad antioxidante (valor ORAC) y el contenido de polifenoles totales de más de 350 especies alimentarias [223]. No obstante, en el 2012 fue retirada por la misma entidad, argumentando un mal uso, principalmente por las empresas de alimentos y suplementos dietarios, al fomentar comparaciones entre resultados obtenidos externamente con aquellos consignados en la base de datos, promocionando productos y proclamas basados únicamente en estos resultados [224]. Esto sumado a la ausencia de un método normalizado en conjunto con la poca robustez y alta variabilidad atribuida, hacen de ORAC un método poco extrapolable en estudios colaborativos entre laboratorios [225]. Por lo tanto, las comparaciones que den lugar entre diferentes muestras, de preferencia deberían realizarse bajo la misma metodología y en el mismo laboratorio. En este sentido, cabe mencionar que los valores encontrados en *G. madruno* superan los obtenidos para otras matrices evaluadas en el laboratorio. En el caso de *Theobroma cacao* por ejemplo, un estudio comparativo del contenido de flavanoles y de la actividad antioxidante de granos de cacao provenientes de 18 fincas productoras y distribuidas alrededor del país, muestra que los valores ORAC obtenidos varían en un rango entre 40.390 y 63.951 $\mu\text{mol Trolox}/100\text{ g}$ de muestra seca [226]. Otro ejemplo los constituyen los extractos obtenidos de 11 especies utilizadas en la medicina tradicional en el Oriente Antioqueño como plantas anti-inflamatorias, de las cuales los valores ORAC obtenidos variaron en un rango entre los 68.000 y 367.000 $\mu\text{mol Trolox}/100\text{ g}$ de extracto, en comparación con los 640.000 $\mu\text{mol Trolox}/100\text{ g}$ del extracto obtenido a partir de la matriz de hojas [221].

6.2.2 Mecanismo antioxidante y relación estructura actividad

Los compuestos antioxidantes pueden estabilizar RLs bajo los siguientes mecanismos: i) transferencia de un átomo de hidrogeno (HAT) en donde el compuesto dona un átomo de hidrogeno directamente a un radical; ii) perdida secuencial de un protón por la transferencia de un electrón (SPLET) en la cual la desprotonación del compuesto en el solvente de reacción es seguida por la transferencia de un electrón desde el anión formado al RL; y iii) transferencia de un electrón acompañada de un protón (SET-PT) en donde el compuesto transfiere un electrón para desactivar el RL seguido de la abstracción del protón en presencia de agua. Adicionalmente como variante del tercer mecanismo se encuentra el mecanismo SET (transferencia de un solo electrón) el cual está aplicado a procesos de reducción especialmente de metales de transición [227–229] (Figura 23). A pesar de que independientemente del mecanismo empleado el producto final obtenido siempre será el mismo, las rutas y cinéticas empleadas difieren entre cada uno de estos. Así mismo los compuestos antioxidantes actuarán bajo la preferencia de un mecanismo o la combinación de algunos de estos. Comúnmente se han relacionado la entalpia de disociación del enlace O-H (BDE) y el potencial de ionización (IP) como los principales factores que delimitan el mecanismo y la eficacia de un antioxidante [230,231]. Con respecto a los compuestos fenólicos y en especial a los flavonoides, los mecanismos atribuidos son variables y en muchos casos dependientes de factores externos como el solvente y el pH del medio de reacción [229,232]. Por lo tanto, en pro de determinar el mecanismo antioxidante predominante de los diferentes biflavonoides y a su vez lograr contextualizar la actividad de las moléculas, con los flavonoides estructuralmente relacionados y con otros flavonoides considerados como referentes, se planteó un estudio de relación estructura actividad (REA) con 11 flavonoides diferentes empleando las metodologías de análisis ORAC y FRAP como métodos de referencia.

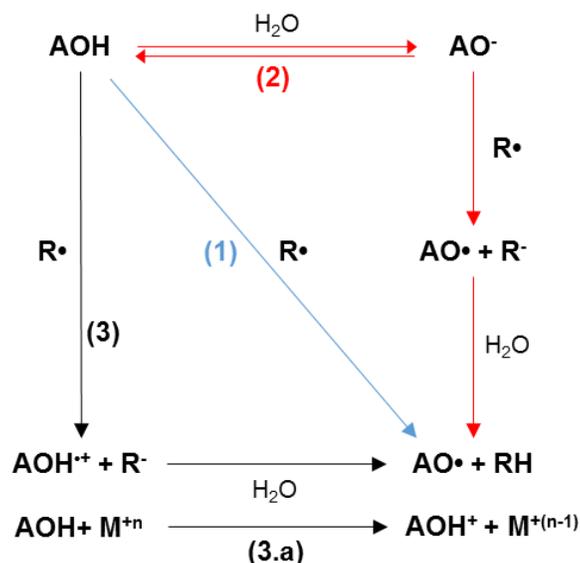


Figura 23. Mecanismos antioxidantes de compuestos fenólicos. Las rutas (1), (2) y (3) constituyen la actividad captadora de RLs por los mecanismos HAT, SPLET y SET-PT, respectivamente. El mecanismo SET (3.a) está asociado al potencial reductor de los compuestos fenólicos evaluado sobre metales de transición. Figura adaptada de [227]

En la Figura 24 se presentan los resultados consolidados del estudio REA de flavonoides por el mecanismo SET empleando la metodología de FRAP. Los métodos antioxidantes basados en SET evalúan el potencial antioxidante de un compuesto al transferir un electrón y producir la reducción de un sustrato. Entre los sustratos posibles están: los metales, carbonilos y RLs [233]. La actividad en los métodos SET está asociada principalmente a la capacidad de desprotonación y al IP de los grupos funcionales involucrados en la actividad, por tanto las reacciones mediadas por SET son pH dependientes. De forma general, el IP disminuye conforme aumenta el pH y como resultado se aumenta la capacidad electrodonadora y por consiguiente la desprotonación [234]. Específicamente en FRAP (Figura 24-B), el mecanismo del método, tal como su nombre lo indica (Ferric Reducing Antioxidant Power), se basa en el poder reductor ejercido sobre un complejo del hierro $[\text{Fe}-(\text{TPTZ})_2]^{3+}$ mediante la transferencia de un electrón, obteniendo como resultado el complejo $[\text{Fe(II)}-(\text{TPTZ})_2]^{2+}$ detectable a una longitud de onda de 593 nm [235]. A diferencia de la mayor parte de pruebas antioxidantes disponibles, FRAP se caracteriza por: i) determinar la capacidad reductora de una sustancia o mezcla de sustancias y no la actividad captadora frente a un RL, y ii) por presentar un mecanismo completamente SET. Estas cualidades hacen de FRAP una metodología adecuada para la determinación de los mecanismos involucrados en la actividad antioxidante, especialmente aplicable a estudios de REA. Los resultados obtenidos en FRAP se asocian con el poder reductor de una sustancia, que a nivel fisiológico podría estar correlacionado con el mantenimiento redox del plasma y

tejidos. Sin embargo, el tiempo de latencia, el pH ácido empleado y la obtención de metales de transición reducidos de características pro-oxidantes como producto de reacción (Figura 2), hacen de FRAP un método valioso en cuanto a la información química suministrada pero poco significativa conforme a la extrapolación fisiológica de sus resultados [230,231,235].

La Figura 24-A muestra los resultados obtenidos para cada uno de los once flavonoides evaluados a 100 μ M. Los resultados fueron expresados en términos de μ M de Trolox/ μ M de compuesto, normalizando de esta forma los resultados en comparación con la actividad del Trolox. En orden ascendente los resultados obtenidos para el valor FRAP fueron: naringenina (Na) < apigenina (Ap) < amentoflavona (Am) < biapigenina (BIA) < volkenisflavona (Vo) < catequina (Ca) < moreloflavona (Mo) < luteolina-7-O-glucosido (Lu7G) < fukugisido (Fu) < luteolina (Lu) y quercetina (Q). Los compuestos Na, Ap, Am, BIA y Vo presentaron una actividad comparable con la del Trolox. Por su parte los compuestos Ca, Mo, Lu7G, Fu, Lu y Q presentaron como mínimo una actividad dos veces mayor en comparación con la del Trolox.

En cuanto a los flavonoides, los resultados obtenidos concuerdan con datos reportados siendo la Q el compuesto con mayor actividad [235]. De esta forma el doble enlace entre el C₂ y el C₃, el OH en R₂, y los hidroxilos del grupo catecol (3',4'-ortodihidroxi) en el anillo B (OH= R₆ y R₇) (Figura 24-C) se constituyen como los grupos funcionales que promueven en mayor medida la actividad antioxidante por este mecanismo. En contra posición la ausencia de estos tres grupos funcionales como en el caso de Na, significó la menor actividad encontrada. Tomando como base la estructura de la Na, la inclusión del doble enlace entre C₂ y C₃, no representó un cambio significativo en la actividad (Ap, Am, BIA y Vo). Por otro lado en la Ca la presencia de los hidroxilos en R₂, R₆ y R₇ aumentó la actividad en un 100% con respecto a Na, pero en comparación con Q, el otro flavonoide evaluado con un grupo catecol y un hidroxilo en C₃, la actividad de la Ca fue aproximadamente un 50% la de la Q. Por lo tanto, el doble enlace entre C₂ y C₃ y el carbonilo en R₃, grupos funcionales ausentes en la Ca, se constituyen como grupos sinérgicos a los hidroxilos en R₂, R₆ y R₇, permitiendo la deslocalización de los hidroxilos del anillo B y el aumento de la actividad reductora de estos flavonoides [187]. Por su parte las flavonas Lu y Lu7G presentaron gran actividad confirmando que la combinación del grupo catecol y el doble enlace representan requerimientos químicos de actividad. En cuanto al efecto de los glucósidos, los resultados obtenidos fueron contrarios, para Lu, la inclusión de un O-Glu en R₅ disminuyó la actividad, a diferencia de Mo en donde su glucósido, el Fu, presentó una mayor actividad. De forma general, si bien se han establecido relaciones entre el número de hidroxilo y la actividad por esta metodología [235], en la evaluación conjunta de monómeros y dímeros de flavonoides no existe correlación alguna, ya que todos los biflavonoides evaluados contienen más grupos hidroxilos que la propia Q.

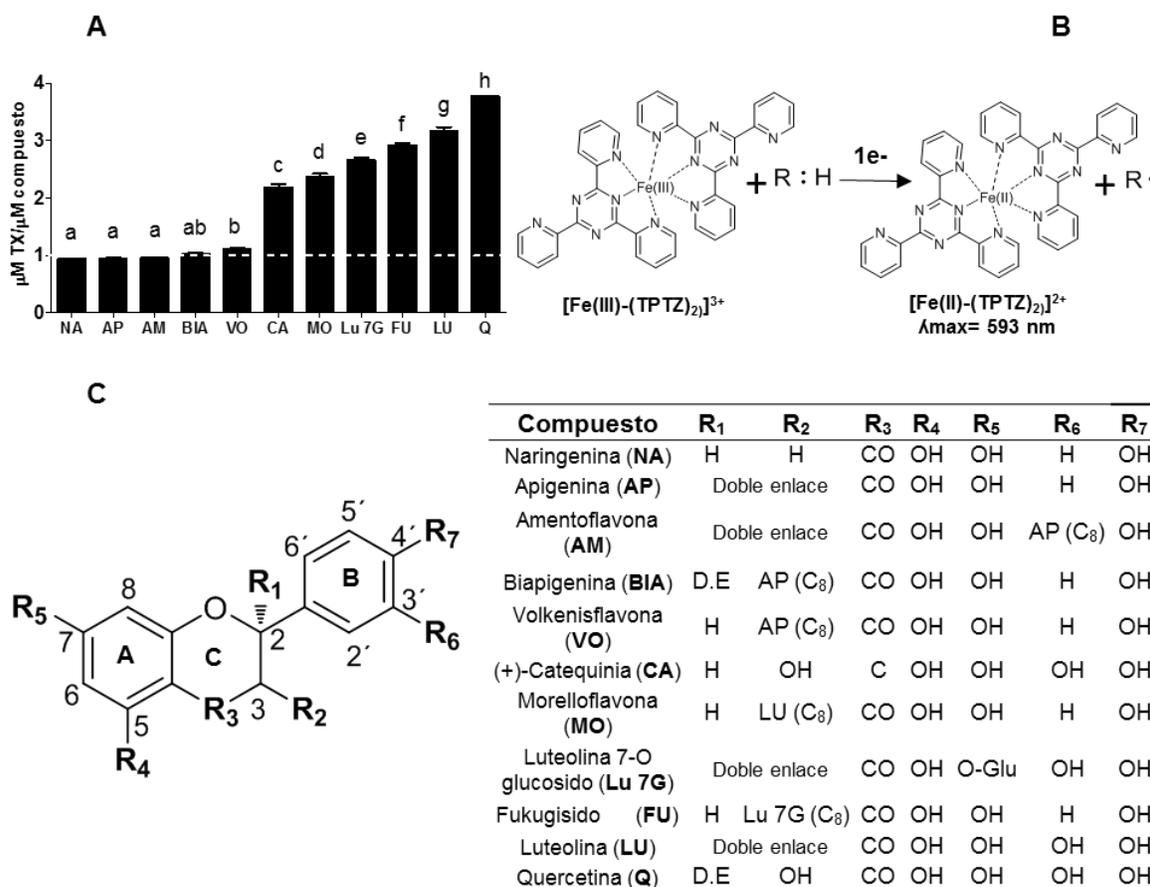


Figura 24. Relación estructura actividad de biflavonoides y flavonoides estructuralmente relacionados evaluados mediante el mecanismo SET. A) Resultados obtenidos para cada flavonoide, B) mecanismo de reacción del método FRAP y C) estructuras involucradas en el estudio REA. De acuerdo a un ANOVA columnas con diferentes letras presentan diferencias significativas (valor $p < 0.05$), NS = no significativo; * significativo (valor $p < 0.05$); ** fuertemente significativa (valor $p < 0.01$) y *** altamente significativa (valor $p < 0.001$).

Con respecto a los biflavonoides, se demuestra que la actividad de estos depende exclusivamente de los flavonoides de los cuales este compuesto. De esta forma, los biflavonoides más activos fueron Mo y Fu, los cuales están constituidos por Lu y Lu7G, respectivamente. Adicionalmente el acople flavonoide-flavonoide no proporciona un efecto sinérgico en Mo. De hecho se observa un efecto antagónico presentándose una disminución de la actividad de Lu con respecto a Mo. En el caso del Fu se observa un aumento de la actividad de este compuesto en relación a Lu7G, sin embargo es inferior a la suma de los dos flavonoides individuales. Así mismo, el acoplamiento entre dos flavonoides que no contenían el grupo catecol (Am, BIA y Vo), no generó diferencia alguna con respecto a la actividad de sus respectivos monómeros (Ap y Na). De igual forma, el

lugar de enlace interflavonoide tampoco jugó ningún rol en especial en los resultados encontrados entre Am y BIA.

A nivel de los productos de reacción generados por este método, se han reportado derivados quinónicos en el anillo B como producto de oxidación de flavonoles y flavonas que contengan principalmente el grupo catecol en el anillo C (Ej. quercetina, y luteolina) [235]. En cuanto a los biflavonoides, un estudio sugiere la formación de estos derivados quinónicos en los flavonoides Lu y Lu7G correspondientes a Mo y Fu respectivamente [110]. Por consiguiente, teniendo presente que tanto flavonoides como biflavonoides generan los respectivos productos de oxidación, la disminución de la actividad encontrada en algunos biflavonoides con respecto a su flavonoide más activo estaría asociada probablemente con un impedimento estérico, impidiendo así la reducción eficiente del complejo $[\text{Fe}-(\text{TPTZ})_2]^{3+}$. Finalmente, si bien no se evidenció en ninguno de los casos un efecto sinérgico completo en lo biflavonoides evaluados, no es posible descartar del todo este efecto. En futuros trabajos la evaluación de la actividad de biflavonoides, preferiblemente aquellos que cuenten con dos flavonoides que contengan el grupo catecol en el anillo B proveería la información necesaria en procura de determinar si estos pueden actuar de forma conjunta o si únicamente un flavonoide tiene la capacidad de reducir el complejo del hierro.

En la Figura 25 se presentan los resultados consolidados del estudio REA de flavonoides empleando la metodología de ORAC. De forma mecanística (Figura 25-B), el método se basa en la habilidad de las sustancias de prueba en estabilizar los radicales peroxilos ($\text{ROO}\cdot$) formados por la descomposición térmica del AAPH. La base del ensayo consiste en la oxidación de una sonda fluorescente (en este caso fluoresceína) por parte de los radicales $\text{ROO}\cdot$, a un producto oxidado no fluorescente. La cuantificación de la actividad antioxidante se realiza conforme a la disminución de la tasa de decaimiento de la fluorescencia en el tiempo en presencia de los compuestos antioxidantes. [230,236]. Tradicionalmente, ORAC había sido relacionado como un ensayo basado en el mecanismo HAT [230,236], sin embargo algunos reportes indican que la estabilización de radicales deficientes de electrones (Ej. $\text{ROO}\cdot$) por parte de compuestos de tipo fenólico se ve favorecida por el mecanismo SPLET (Figura 23), en aquellas metodologías en donde se empleen solventes que favorezcan la ionización de estos compuestos [228,229,232]. Por tal motivo, en la actualidad no existe un mecanismo definitivo. Si bien, el medio empleado en ORAC favorece en gran medida la ionización de los compuestos fenólicos y por ende el mecanismo SPLET, no es totalmente descartable que se presente conjuntamente el mecanismo HAT. En los métodos basados en este último mecanismo, la actividad de las sustancias se ha correlacionado directamente con el BDE de estas. Sin embargo, los resultados obtenidos por [228] en una estudio de REA de flavonoides con respecto a la captación de radicales peroxilo por el método de ORAC, indican que el BDE no se correlaciona con los resultados obtenidos, siendo la afinidad de protón y la entalpía de

transferencia de electrón los parámetros más correlacionados para esta prueba. De esta forma se reafirma SPLET como el mecanismo antioxidante predominante para compuestos tipo flavonoides bajo la metodología ORAC.

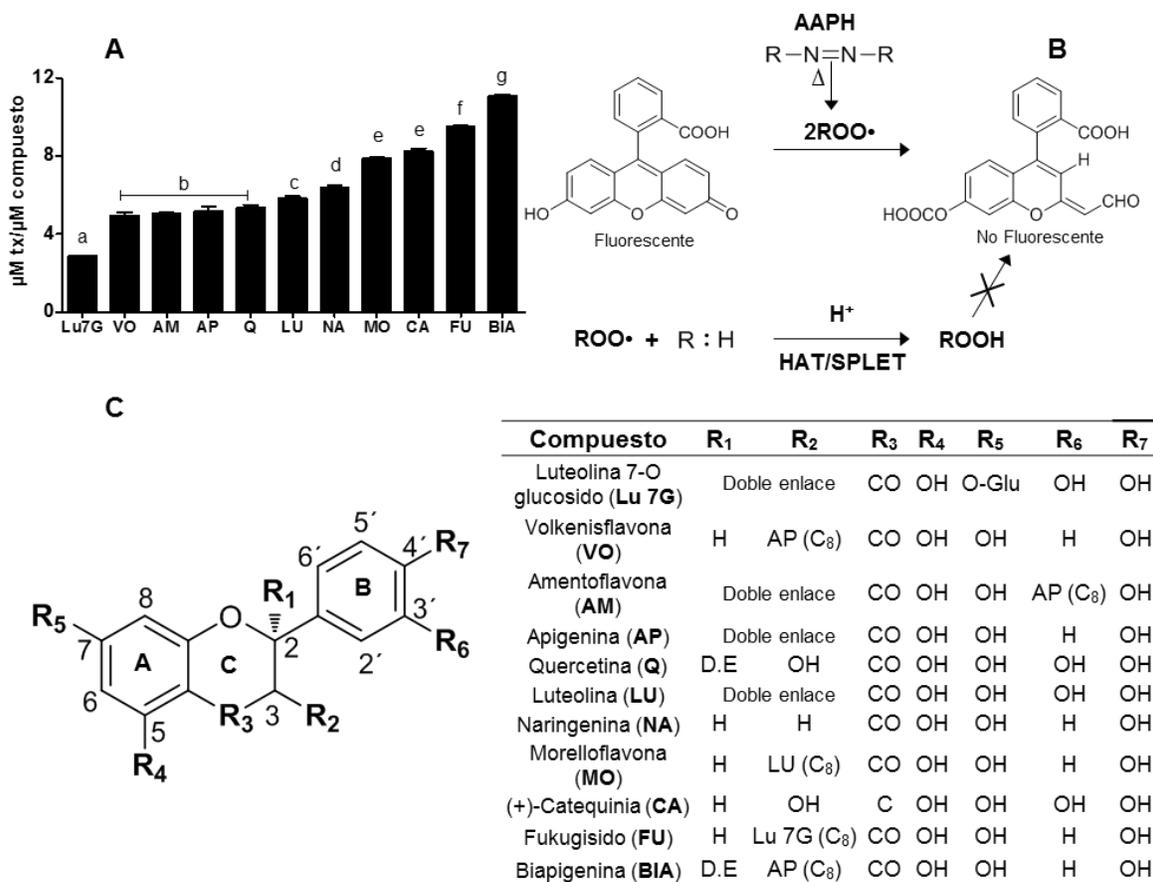


Figura 25. Relación estructura actividad de biflavonoides y flavonoides estructuralmente relacionados evaluados mediante el mecanismo SPLET/HAT. A) Resultados obtenidos para cada flavonoide, B) mecanismo de reacción del método ORAC y C) estructuras involucradas en el estudio REA. De acuerdo a un ANOVA columnas con diferentes letras presentan diferencias significativas (valor $p < 0.05$), NS = no significativo; * significativo (valor $p < 0.05$); ** fuertemente significativa (valor $p < 0.01$) y *** altamente significativa (valor $p < 0.001$).

A nivel fisiológico los resultados de ORAC tienen más relevancia que los presentados en FRAP. Como se trató anteriormente el radical peroxilo se encuentra entre las ERs de mayor importancia a nivel fisiológico, estando muy relacionado en la peroxidación lipídica y en los procesos propagación a nivel oxidativo. En adición, las condiciones de temperatura y pH del método emulan de cierta forma las condiciones reales. Sin embargo, estudios de REA de flavonoides entre una metodología ORAC y un modelo celular, el cual es de mayor relevancia a nivel fisiológico, muestra poca correlación entre ellos [237]. Por lo tanto, en lo que concierne a ORAC y en general a todos los métodos químicos empleados para la

evaluación de la actividad antioxidante, la relevancia fisiológica de estos aún se mantiene en discusión. A pesar de esto, los métodos químicos para la evaluación de la actividad antioxidante y en especial ORAC, son ampliamente difundidos y utilizados como medida de tamizaje en el desarrollo de alimentos funcionales, “cosmecéuticos”, fitoterapéuticos, suplementos dietarios, entre otros. De ahí la importancia de su evaluación.

La Figura 25-A muestra los resultados obtenidos para los once flavonoides evaluados a 10 μM cada uno. Los resultados fueron expresados como μM de Trolox/ μM de compuesto, favoreciendo de esta forma la normalización de los resultados conforme a la actividad del Trolox. En orden ascendente los resultados obtenidos para el valor ORAC fueron: Lu7G < Vo < Am < Ap < Q < Lu < Na < Mo < Ca < Fu y BIA. Todos los flavonoides evaluados presentaron una actividad superior a la del Trolox en un rango de variabilidad entre 2.9 y 11.1 veces. En este caso, Lu7G fue el flavonoide que presentó menor actividad, y los compuestos Vo, Am, Ap y Q presentaron una actividad similar (valor- $p > 0.05$) cercana a 5 veces la actividad obtenida por el Trolox. A partir de Lu hasta BIA se presentaron incrementos progresivos, exceptuando Mo y Ca, los cuales fueron estadísticamente significativos entre cada uno de ellos (valor- $p < 0.05$). Por su parte los resultados del valor ORAC de los flavonoides evaluados son semejantes a los previamente reportados, siendo Ca y Na los flavonoides con mayor actividad [228,237].

En cuanto a los biflavonoides, cabe resaltar que 3 de los 4 compuestos con mayor actividad correspondieron a biflavonoides. De igual forma que en FRAP, Mo y Fu fueron los biflavonoides de *G. madruno* con mayor actividad antioxidante. De esta forma, a diferencia de los resultados obtenidos en el mecanismo anterior, el acople flavonoide-flavonoide en este caso, sí produjo un sinergismo, potencializando la actividad de Mo y Fu con respecto a su monómero más activo (Na). De hecho en el caso del Fu, el valor ORAC obtenido (9.51 μM de Trolox/ μM de compuesto) es superior a la sumatoria de sus flavonoides constitucionales evaluados individualmente: Lu7G (2.87 μM de Trolox/ μM de compuesto) + Na (6.40 μM de Trolox/ μM de compuesto) para un total de 9.27 μM de Trolox/ μM de compuesto. En el caso de Mo si bien su valor ORAC no es equiparable a la sumatoria de sus monómeros (Na+ Ap), el valor obtenido es superior con una diferencia estadísticamente significativa ($p < 0.01$) con respecto a Na. En cuanto a los demás biflavonoides, es probable que la Ap ejerza un efecto antagónico en la actividad, sin embargo el compuesto con mayor actividad corresponde a la BIA, por tanto las conjeturas a nivel estructural que se puedan realizar son limitadas.

Finalmente, se resalta que los grupos funcionales ampliamente relacionados por aumentar o ser responsables de la actividad captadora de radicales libres (grupo catecol en el anillo B, el doble enlace entre C_2 y C_3 y el hidroxilo en R_2), bajo esta metodología y basados en los resultados obtenidos y reportados [228,237] no juegan un rol significativo. De esta

forma, la comprensión del modo de acción y la subsecuente actividad de los flavonoides y biflavonoides evaluados, deberá encaminarse desde otro punto de vista, dejando a un lado los grupos funcionales presentes y abordando de forma exhaustiva los parámetros energéticos relacionados con los posibles mecanismos de reacción aplicando medidas basadas en la química cuántica, principalmente.

7 ESTUDIO FARMACOCINÉTICO DE BIFLAVONOIDES DE *GARCINIA MADRUNO*

7.1 MATERIALES Y MÉTODOS.

7.1.1 Estudio farmacocinético

Para el estudio farmacocinético fueron utilizadas 18 Ratas Wistar (grado SPF), machos, de 20 semanas de edad y 358 ± 29 g de peso. 12 horas antes del inicio del estudio farmacocinético, a los animales se les suspendió el alimento y 4 horas después de la administración de los biflavonoides se les volvió a suministrar. En todo momento los animales tuvieron a disposición agua *ad libitum*. El total de animales fue dividido en tres grupos experimentales para un n=6 en cada uno de ellos. El primer grupo recibió un mix de flavonoides: Na, Ap y Lu a una concentración de 20.0 mg/kg de peso de cada uno de los flavonoides. El segundo grupo se le administró un mix de biflavonoides a una concentración de 2.41, 30.10, 13.10 y 13.51 mg/kg de peso de Fu, Mo, Vo y Am respectivamente. Por su parte el tercer grupo recibió el extracto estandarizado de hojas de *G. madruno* (capítulo 5) a una dosis de 400 mg/kg de peso, correspondiente a 81.12, 31.84, 4.28 y 8.12 mg/kg de peso de Fu, Mo, Vo y Am respectivamente. Para todos los grupos experimentales, los compuestos fueron disueltos en un sistema de Agua/propilenglicol/DMSO a una proporción 40:40:20 y administrados vía oral por sonda orogástrica (8 mL/kg de peso). Una vez administradas las soluciones correspondientes en cada grupo experimental, se colectaron muestras de sangre de la vena de la cola (≈ 350 μ L) en tubos con K₂EDTA a los siguientes tiempos: 0.17, 0.68, 1.34, 2.0, 3.0, 4.0, 5.0, 6.0, 8.0, 12.0 y 24.0 horas. Inmediatamente después de ser recolectadas las muestras, estas fueron centrifugadas a 3700 rpm por 8 minutos a 4°C y el plasma resultante fue almacenado a -80°C hasta su posterior análisis por UHPLC-MS/MS. Todos los procedimientos que involucraron el uso de animales fueron abalados por el comité de ética para la experimentación con animales de la Sede de Investigación Universitaria (SIU) de la Universidad de Antioquia.

Los parámetros farmacocinéticos de los flavonoides y biflavonoides fueron determinados empleando un modelo no compartimental (mNC) tomando como base lo reportado por [238]. El área bajo la curva (ABC) (de cero a t_{final}) fue calculado mediante la regla del trapecio lineal. El tiempo de vida media ($t_{1/2}$) fue calculado empleando la ecuación $t_{1/2} = 0.693/\lambda_z$, donde λ_z corresponde a la pendiente de la recta del ln de la concentración de los datos terminales vs el tiempo. El ABC (de cero a infinito) fue calculado como la suma del $ABC - t_{final} + C_{final}/\lambda_z$. El área bajo la curva del primer momento ABCP se calculó empleando la regla del trapecio lineal entre la concentración plasmática*tiempo Vs el tiempo. El $ABCP - \infty$

correspondió a la suma entre ABCP y $C_{\text{final}}/\lambda_z^2$. El tiempo medio de residencia (TMR) se determinó como ABCP/ABC. La concentración máxima (Cmax) y el tiempo máximo (Tmax) se hallaron de forma experimental. Finalmente el análisis estadístico, la determinación del área bajo la curva, la obtención de modelos de regresión lineal y las pendientes correspondiente se realizaron empleando el programa estadístico GraphPadPrism® Versión 5.00 para Windows, (GraphPad software, Inc, San Diego CA 2007).

7.1.2 Instrumentación y condiciones analíticas

El análisis fue realizado en un UHPLC Dionex Ultimate 3000 (Thermo Scientific, USA) acoplado a un triple cuadrupolo TSQ Vantage con fuente de ionización electro spray (H-ESI-II probe) (Thermo Scientific, USA). La separación de flavonoides y biflavonoides se realizó usando una columna de rápida resolución y alto rendimiento Zorbax SB-C18® (50mm x 4.6mm con 1.8µm de tamaño de partícula), con un flujo de 0.5 mL/min y una temperatura de 35°C. La fase móvil consistió en agua con 0.05% de ácido acético (A) y acetonitrilo con 0.05% de ácido acético (B). El gradiente lineal utilizado fue el siguiente: 0 min, 40.0% B; 1.2min, 40.0% B; 3.4min, 66.9% B; 3.8min 95.0% B; 6.3min 95% B, 6.35min 40.0% B; 7.5min 40.0% B. El volumen de inyección fue de 10µL y el tiempo total del corrido fue de 7.5 min. El espectrómetro de masas fue operado en modo negativo y la cuantificación de los analitos fue realizada empleando el modo SRM (en inglés selected reaction monitoring). Las condiciones óptimas de la fuente de ionización fueron las siguientes: temperatura de la fuente ESI, 405 °C; voltaje del spray, 2000 V; presión del gas de arrastre, 30 psi; y presión del gas auxiliar, 5 psi. Las transiciones de masas seleccionadas y las condiciones específicas de análisis en modo SRM para cada analito se detallan en la Tabla 10.

7.1.3 Soluciones estándares, curva de calibración y muestras de control de calidad (QC)

Partiendo de los estándares de referencia de Mo, Vo, Am, Na, Ap, Lu y el estándar interno warfarina (IS) se prepararon soluciones madre independientes de 1 mg/mL empleando metanol como solvente. Como punto de partida para la elaboración de las curvas de calibración, tres soluciones stock de un mix de flavonoides y biflavonoides a 2000 ng/mL, y una del IS a 5000 ng/mL fueron preparadas a partir de las soluciones madres usando fase móvil como diluyente. A partir de cada solución stock de los analitos de interés y del IS se prepararon 7 soluciones de trabajo a las siguientes concentraciones: 10, 20, 50, 100, 250, 500, 800 y 1000 ng/mL de Mo, Vo, Am, Na, Ap y Lu, manteniendo una concentración constante de 1000 ng/mL del IS en cada una de estas soluciones. Los niveles de calibración finalmente se obtuvieron mediante una dilución 1 en 10 de las respectivas soluciones de trabajo, utilizando una matriz de plasma blanco como diluyente. Cada nivel se evaluó por

triplicado y cada replica provino de una solución stock independiente. Finalmente los niveles de calibración evaluados correspondieron a: 1, 2, 5, 10, 25, 50, 80 y 100 ng/mL para Mo, Fu, Vo, Am, Na, Ap y Lu con una concentración final de 100 ng/mL de IS. Como muestras control (QC) para la ejecución de la validación y el análisis rutinario de las muestras se utilizaron los niveles de concentración de 10, 25 y 80 ng/mL correspondientes a los controles bajo, medio y alto, los cuales fueron preparados de la misma forma que los niveles de concentración de la curva de calibración. De forma general las soluciones stock se prepararon semanalmente almacenándose a -20°C, y las soluciones de trabajo y niveles de calibración al momento de requerirse.

7.1.4 Preparación de las muestras

170 µL de plasma fueron hidrolizados por 4 horas a una temperatura de 37 °C con 74 µL de un coctel enzimático compuesto por β-glucuronidasa y sulfatasa en un medio compuesto por vitamina C y buffer acetato (0.25 mM). La solución resultante contenía 900 UI/mL, 50 UI/mL y 0.6 mg/mL de β-glucuronidasa, sulfatasa y vitamina C respectivamente. La precipitación de proteínas y la eliminación de fosfolípidos se realizó de forma conjunta empleando cartuchos comerciales (Captiva-non lipids, Agilent®). Para esto, 935 µL de acetonitrilo al 0.05% de ácido acético fueron agregado en frio al cartucho, seguido de 30 µL de estándar interno (en acetonitrilo) y 235 µL de muestra del plasma hidrolizado. La mezcla formada fue agitada con micropipeta 5 veces, los cartuchos fueron eluidos empleando vacío en un manifold SPE Visiprep™-24 (Supelco, USA) y el producto fue recolectado en viales de cromatografía. Para el caso de muestras de plasma blanco, el producto obtenido fue recolectado y empleado como matriz diluyente en la preparación de los niveles de calibración, muestras QC y en los proceso de la validación que lo requirieron. Por su parte en las muestras de análisis de los grupos 2 y 3, la matriz obtenida fue secada al vacío a una temperatura de 35°C por 30 minutos (Centrivap, Labconco) y el sólido obtenido fue resuspendido en 300 µL de fase móvil. Para el caso del grupo 1 una alícuota de la matriz eluida fue disuelta 1 en 2 en matriz de plasma blanco. Las soluciones finales obtenidas para cada grupo fueron filtradas por 0.22 micras y 10 µL del filtrado fueron inyectados al UHPLC para el respectivo análisis. En todos los casos la concentración del IS en la solución final fue de 100 ng/mL.

7.1.5 Validación del método

El método para la cuantificación de biflavonoides de *G. madruno* y flavonoides estructuralmente relacionados en plasma de rata fue completamente validado conforme a lo estipulado por las principales guías de validación de métodos bioanalíticos [239–241], con respecto a los parámetros: selectividad, linealidad, LLOQ, precisión y exactitud, % recuperación, efecto matriz, estabilidad y carry-over.

La selectividad fue evaluada por comparación de los cromatogramas obtenidos de 6 muestras blanco de plasma con grado de hemolisis diferente con respecto al blanco de plasma dopados con los analitos y el IS y muestras de plasma obtenidas en un tiempo de 2 horas. La curva de calibración fue realizada partiendo de tres soluciones stocks diferentes. Para todos los analitos se corrieron 7 niveles de calibración (1-100 ng/mL) en matriz. La linealidad de cada curva fue determinada graficando la concentración nominal de cada nivel (eje X) vs la relación de la respuesta del área del analito frente al IS (área analito/área IS) (eje Y) y el ajuste matemático se realizó mediante el modelo de regresión lineal. Con el rango evaluado se determinó el LLOQ como la concentración más baja a la cual se alcanzaba cuantificar con valores aceptables de precisión y exactitud, 20 %CV y 20 ER % respectivamente.

La evaluación de la precisión y exactitud del método se realizó evaluando 4 réplicas diferentes de cada uno de los niveles de las muestras QC en tres días diferentes. La precisión fue definida como el CV intra día e inter día, mientras que la exactitud como el %ER de las 12 determinaciones de cada uno de los niveles evaluados. Como criterio de aceptación se escogió un máximo de un 15 % para cada uno de los parámetros.

El efecto matriz fue determinado mediante la comparación de las respuestas obtenidas entre cada uno de los niveles de las muestras QC preparadas con matriz blanco con respecto a las preparadas con fase móvil. Por su parte, la recuperación del método fue evaluada comparando las respuestas obtenidas de una muestra blanco pre-enriquecida y sometida al proceso de extracción frente a los resultados obtenidos de las muestras post-enriquecidas (muestras de efecto matriz). Los resultados en ambos casos fueron expresados en porcentaje y como parámetro de aceptación en todos los casos, el CV de los resultados obtenidos no podía ser superior al 15% con un n=5 en cada uno de los niveles evaluados. En el caso del IS se determinó la recuperación y el efecto matriz a la concentración nominal de 100 ng/mL (n=5).

La estabilidad de los respectivos analitos fue evaluada con muestras por triplicado de blanco de plasma de rata dopadas con las muestras QC a los tres niveles de concentración en las siguientes condiciones: i) 4 horas a temperatura ambiente, ii) 8 horas a 15° C y iii) 45 días a -20 °C. El carry-over fue medido inyectando una muestra de plasma blanco justo después de una del máximo nivel de calibración (100 ng/mL). Este procedimiento se realizó por triplicado. El efecto carry-over se considera despreciable cuando la respuesta de cada analito en la muestra blanco es inferior al 20% de la respuesta del LLOQ.

El carry-over fue medido inyectando una muestra de plasma blanco justo después de una del máximo nivel de calibración (100 ng/mL). Este procedimiento se realizó por triplicado.

El efecto carry-over se considera despreciable cuando la respuesta de cada analito en la muestra blanco es inferior al 20% de la respuesta del LLOQ.

7.2 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

7.2.1 Desarrollo y optimización de la metodología analítica

La optimización de las condiciones del espectrómetro de masas se realizó frente a diversos aspectos. En principio, los 6 compuestos evaluados en conjunto con el IS tuvieron una mejor respuesta en modo negativo que en modo positivo. A nivel de la fuente de ionización utilizada (ESI), se optimizaron los principales parámetros de forma simultánea para todos los analitos, obteniendo los siguientes valores: temperatura de la fuente ESI, 405 °C; voltaje del spray, 2000 V; presión del gas de arrastre, 30 psi; y presión del gas auxiliar, 5 psi. Las condiciones de la celda de colisión y el Q3 para el modo SRM se optimizaron de manera individual para cada analito mediante infusión directa. En la Tabla 10 se muestra la energía de colisión (EC) obtenida para cada uno de las transiciones encontradas de cada uno de los analitos. De los dos iones producto obtenidos, las transiciones de masas seleccionadas conforme a su intensidad fueron: 285.0→132.7 *m/z* para Lu; 555.0→402.8 *m/z* para Mo; 269.0→116.8 *m/z* para Ap; 271.0→119.0 *m/z* para Na; 539.0→413.2 *m/z* para Vo; 537.1→375.0 *m/z* para Am; y 307.4.1→160.9 *m/z* para el IS (warfarina). Las transiciones obtenidas de los analitos: Na, Lu, Ap, Am y el IS coinciden con lo reportado [242–246]. Sin embargo, para los biflavonoides Mo y Vo no se encontraron reportes que elucidaran sus principales productos de fragmentación. Por tanto en procura de elucidar los puntos de ruptura y las estructuras correspondientes a los principales fragmentos formados en la celda de colisión, la Figura 26 muestra el espectro de masas obtenido en modo full-scan de productos para estos biflavonoides así como el esquema de fragmentación propuesto.

Por otra parte la composición de la fase móvil en el análisis de flavonoides por LC-MS/MS, es sin lugar a dudar uno de los factores más influyentes en el desarrollo de métodos robustos y confiables [246]. La capacidad de influir en la ionización y los cambios en la respuesta, retención y forma de los picos es la causa primaria de su importancia. En pro de fijar las condiciones más favorables en el desarrollo y optimización de este método y en procura de obtener la mayor respuesta sin sacrificar la precisión del método, se evaluaron como modificadores del pH: dos ácidos orgánicos (ácido acético y ácido fórmico), y una sal de amonio (acetato de amonio). En todos los casos se empleó acetonitrilo como modificador orgánico. Al emplear una concentración de 2, 5 y 10 mM de acetato de amonio en la fase móvil acuosa se logró aumentar la ionización de todos los compuestos mejorando la sensibilidad del método. Esto se debió a un aumento de la ionización de los analitos en solución a causa del aumento del pH de la fase móvil cercano al pKa de los flavonoides y

biflavonoides evaluados. A nivel cromatográfico, de forma positiva, se vio reflejado una disminución en los tiempos de retención y un aumento de la respuesta, sin embargo la coexistencia de especies ionizadas/no ionizadas contribuyeron a una mayor dispersión en la columna promoviendo un aumento en el ancho del pico y una disminución en la repetibilidad en los tiempos de retención y en las respuestas obtenidas. Los compuestos más afectados con el uso del acetato de amonio en términos de repetibilidad fueron: Mo, Lu y el IS. Por lo tanto, las variaciones en la repetibilidad y la forma del pico de estos compuestos cuando era utilizado el acetato de amonio como modificador del pH hacían de este método, un método poco robusto que no garantizaba la precisión en el tiempo. Por lo cual fue necesario modificar la metodología. La inclusión de un modificador de la acides (ácido acético –ácido fórmico), tanto al componente orgánico como al acuoso, teóricamente está relacionado con una mejor forma del pico, una mayor robustez del método y una mejor precisión en el tiempo, a costa de una disminución comparativa de la sensibilidad alcanzada con el acetato de amonio [246]. Entre las combinaciones analizadas, finalmente a una concentración de 0.05% de ácido acético en el solvente A y B, representó la condición más apropiada que favorecía la precisión del método y sacrificaba en menor medida la respuesta de los analitos.

Tabla 10. Transiciones de m/z obtenidas para cada analito e IS en el modo SRM con su respectiva energía de colisión (EC).

| Analitos | Q1 Masa (Da) | Q3 Masa (Da) | EC (V) |
|----------------------|---------------------|---------------------|---------------|
| Luteolina (Lu) | 285.0 | 132.7 | 35 |
| | | 174.9 | 26 |
| Morelloflavona (Mo) | 555.0 | 402.8 | 28 |
| | | 429.1 | 22 |
| Apigenina (Ap) | 269.0 | 116.8 | 45 |
| | | 149.0 | 28 |
| Naringenina (Na) | 271.0 | 119.0 | 46 |
| | | 150.7 | 21 |
| Volkensiflavona (Vo) | 539.0 | 387.4 | 28 |
| | | 413.2 | 25 |
| Amentoflavona (Am) | 537.1 | 330.8 | 46 |
| | | 375.0 | 30 |
| Warfarina (IS) | 307.4 | 160.9 | 22 |
| | | 250.0 | 26 |

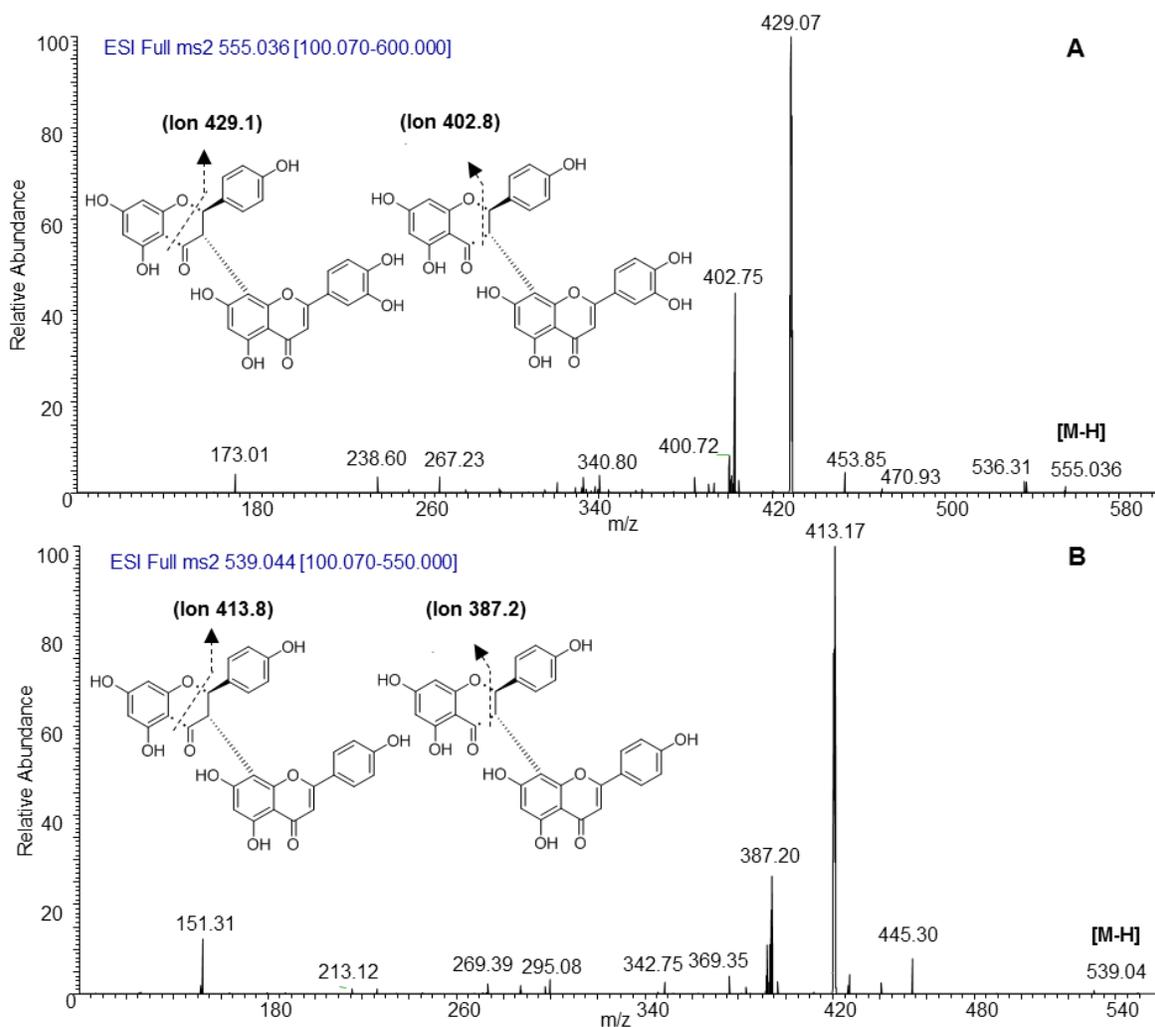


Figura 26. Espectro de masas correspondiente al escaneo completo de productos de los iones precursor [M-H] de los biflavonoides. (Morelloflavona (A) y Volkensiflavona (B))

Adicionalmente el proceso de preparación de muestras fue también optimizado en procura de asegurar la precisión del método, disminuir el efecto matriz, conservar la integridad de columnas y equipos, garantizar una buena recuperación y disminuir los tiempos de análisis. En principio, se empleó a la warfarina como IS debido a que este es un compuesto con características fisicoquímicas similares tanto para flavonoides como biflavonoides, ha sido reportado como IS en ensayos farmacocinéticos de biflavonoides [247,248] y a diferencia de cualquier flavonoide natural, con el uso de la warfarina se aseguraba que el IS no estuviera presente en alguna de las sustancias administradas, principalmente teniendo en cuenta el desconocimiento químico del extracto de *G. madruno* en términos de compuestos diferentes a los biflavonoides. Seguido a esto, se optó por emplear un método novedoso y actual para la eliminación simultánea de proteínas y fosfolípidos en la preparación de

muestras a partir de matrices biológicas empleando los cartuchos de SPE Captiva-non lipids (Agilent®). El principio de este método consiste en la precipitación *in situ* (dentro del cartucho) de las proteínas presentes en una muestra biológica por adición de un solvente orgánico como acetonitrilo/metanol. La eliminación conjunta de proteínas y fosfolípidos ocurre durante el proceso de elución. Las proteínas son retenidas de forma física por la doble capa del filtro una vez hayan sido precipitadas y los fosfolípidos por interacciones moleculares entre el grupo fosfato de estos compuestos y un aceptor de electrones dispuesto en el relleno del cartucho. De esta forma se eliminan las dos principales interferencias relacionadas con el análisis de muestras biológicas por LC tándem masas, relacionadas con interferir en la selectividad del método, generar un efecto matriz influyendo en la ionización de los analitos y promover aumentos en la presión del sistema, daños en columnas y en el sistema en general [249,250]. Entre las principales ventajas de este tipo de metodologías se encuentra la practicidad en su uso y el escaso desarrollo y optimización del método requerido. En este caso empleando acetonitrilo como agente precipitante con la misma concentración de ácido acético empleada en la fase móvil y en una proporción 1 parte de muestra por 4 de solvente, se logró obtener resultados reproducibles en cuanto al volumen recolectado y el tiempo de elución, manteniendo en todo momento los mismos solventes empleados en la fase móvil en procura de garantizar la menor variabilidad en los procesos de ionización.

Por su parte, las condiciones de hidrolisis enzimática de los plasmas obtenidos se estipularon conforme a los reportes de biflavonoides y flavonoides encontrados [242,246,251]. Frente a la concentración enzimática es bien conocido que esta dependerá del contenido de sustrato disponible estando correlacionada directamente con la eficiencia de la conversión y el tiempo requerido para esta. Teniendo presente la posibilidad de encontrar resultados distantes entre los tres grupos experimentales se optó por emplear una concentración enzimática media de acuerdo a los reportes encontrados, fijando el contenido de β -glucuronidasa y sulfatasa en 900 UI/mL y 50 UI/mL respectivamente. Para el tiempo de incubación se realizaron pruebas a 1 y 4 horas en plasma de 24 horas de los tres grupos de prueba bajo las condiciones preestablecidas. Como resultado a las 4 horas de hidrolisis se evidenció un leve aumento en la concentración de los analitos. Lo cual es consecuente con lo reportado para Am en donde no se evidencian cambios significativos después de 4 horas de hidrolisis [242], por tanto se seleccionó 4 horas como tiempo de hidrolisis.

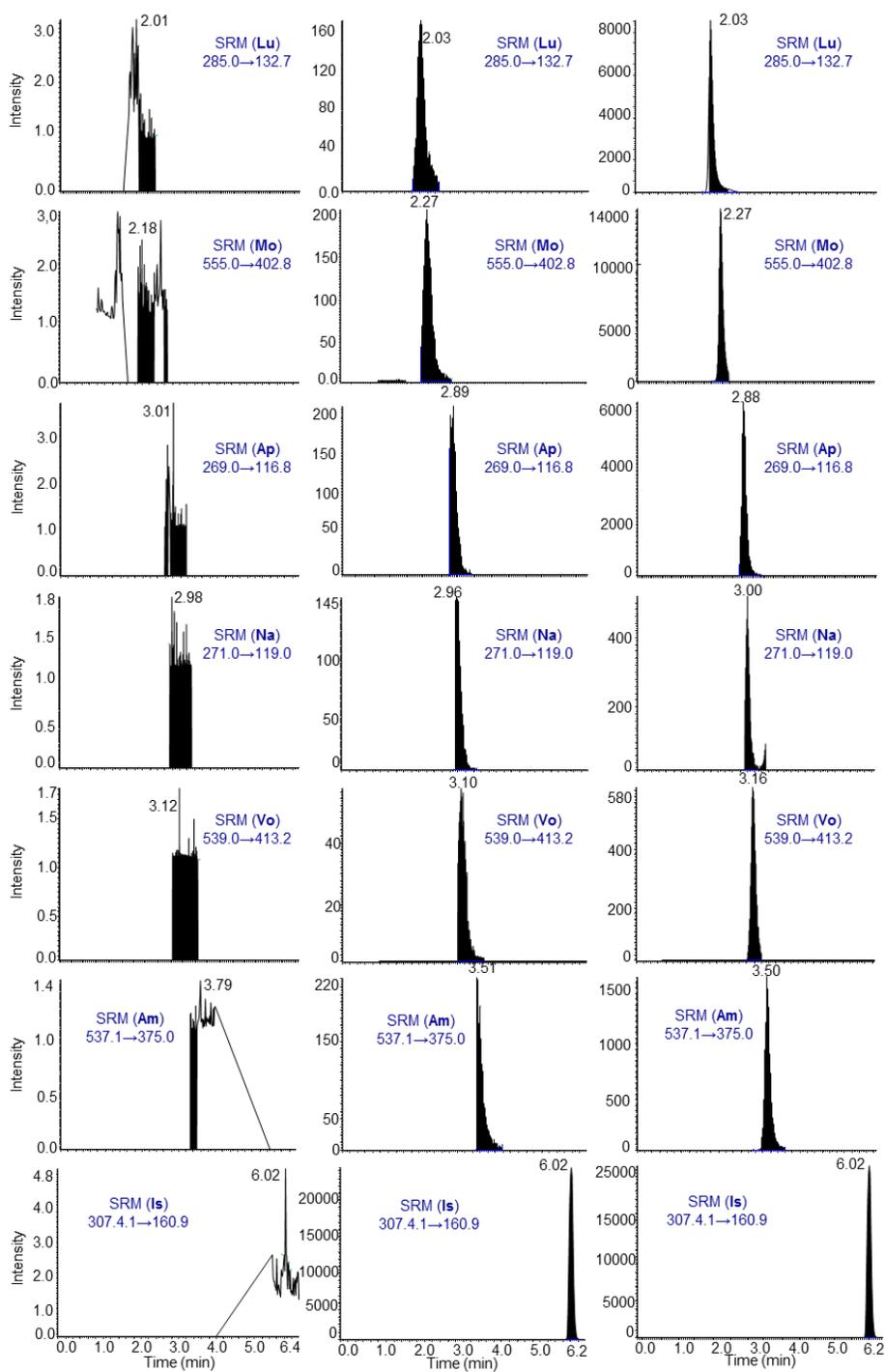


Figura 27. Cromatogramas representativos en modo SRM de los respectivos analitos y el IS obtenidos en plasma blanco hidrolizado (primera columna), en plasma blanco dopado al nivel del LLOQ (segunda columna) y muestras representativas del estudio farmacocinético (tercera columna). El IS fue evaluado a un valor de concentración de 100 ng/mL. Los cromatogramas del estudio farmacocinético corresponden a muestras de plasma a un $t = 2$ horas de los grupos 3 y 1 para biflavonoides y flavonoides respectivamente.

7.2.2 Validación del método

Selectividad: A los tiempos de retención de cada uno de los analitos evaluados (Tabla 11), no se observaron interferencias de tipo endógeno significativas procedentes de las diferentes muestras de plasma blanco evaluados, por tanto se demuestra que el grado de hemólisis no influye en la selectividad del método. La Figura 27 muestra de forma comparativa los cromatogramas LC-MS/MS obtenidos de blancos de plasma hidrolizado, frente a plasma blanco dopado a niveles del LLOQ y una muestra representativa del estudio farmacocinético de cada uno de los analitos en conjunto con el IS.

Linealidad y LLOQ: En la Tabla 11 se muestran las ecuaciones correspondientes a cada una de las curvas de calibración obtenidas para cada compuesto en conjunto con el rango, el LLOQ y el coeficiente de determinación (r^2). Entre los valores obtenidos: el r^2 en todos los casos fue mayor 0.9950. Con respecto al LLOQ, los compuestos Ap, Na, Vo presentaron el mayor LLOQ obtenido (5 ng/mL). Para el caso específico de Ap y Na en el rango total evaluado (1-100 ng/mL) en los niveles inferiores al LLOQ (1 y 2 ng/mL) se presentó detección, sin embargo los resultados interpolados de estos dos niveles no cumplieron con los criterios de precisión y exactitud establecidos (menor al 20 % de CV y %ER). A diferencia, el LLOQ obtenido para Vo correspondió a la concentración más baja detectada. Por su parte, para Lu y Am se obtuvo un LLOQ de 2 ng/mL con detección a 1 ng/mL y con Mo se alcanzó el LLOQ más bajo entre los compuestos evaluados (1 ng/mL). Como rango dinámico para la cuantificación en todos los casos se seleccionó 100 ng/mL como límite superior y el LLOQ respectivo como límite inferior. En la Figura 27 se observa un cromatograma representativo para cada analito a la concentración del LLOQ.

Tabla 11. Ecuaciones de regresión, tiempo de retención, rangos y LLOQ para los biflavonoides y flavonoides evaluados.

| Compuesto | Tiempo de retención (min) | Curva de calibración | r^2 | rango dinámico (ng/mL) | LLOQ (ng/mL) |
|-----------------|---------------------------|------------------------------|--------|------------------------|--------------|
| Luteolina | 2.01 | $Y= 0.003078x + 0.00003980$ | 0.9970 | 2-100 | 2 |
| Morelloflavona | 2.24 | $Y= 0.001651x + 0.002512$ | 0.9950 | 1-100 | 1 |
| Apigenina | 2.87 | $Y= 0.002607x - 0.001276$ | 0.9981 | 5-100 | 5 |
| Naringenina | 2.98 | $Y= 0.0005607x + 0.0003498$ | 0.9959 | 5-100 | 5 |
| Volkensiflavona | 3.15 | $Y= 0.0001210x + 0.00006606$ | 0.9961 | 5-100 | 5 |
| Amentoflavona | 3.55 | $Y= 0.004168x - 0.001795$ | 0.9956 | 2-100 | 2 |
| Warfarina (IS) | 6.02 | -- | -- | -- | -- |

Los resultados obtenidos para la **precisión** intra-día (repetibilidad), inter-Día (precisión intermedia) y **exactitud** para cada uno de los analitos en los tres niveles de calibración evaluados se muestran en la Tabla 12. Para todos los casos, los valores obtenidos estuvieron entre los límites de aceptabilidad (<15% CV y $\pm 15\%$ ER). Con respecto a la

precisión intra-día e inter-día, los valores del CV obtenidos para todos los analitos fueron inferiores a 9.3 y 14.4 %, respectivamente. En el caso de la exactitud, la cual fue medida con las réplicas de la precisión intermedia, todos los valores obtenidos fueron inferiores al |13.5|% de ER. De esta forma se establece que la metodología planteada confiere buena precisión y exactitud en el tiempo, otorgando resultados por debajo de los valores límites permitidos.

Tabla 12. Precisión, exactitud, porcentaje de recuperación y efecto matriz de cada uno de los analitos evaluados

| Compuestos | Nivel (ng/mL) | Intra-Día (CV%, n= 4) | Inter-Día (CV%, n=12) | Exactitud (ER%, n=12) | % EM (CV%, n=5) | % R (CV%, n=5) |
|------------------------------|-------------------------|---------------------------------|---------------------------------|---------------------------------|---------------------------|--------------------------|
| Biflavonoides | | | | | | |
| | 10 | 5.0 | 10.1 | 0.5 | 93.9 (8.4) | 91.9 (1.3) |
| Moreloflavona | 50 | 1.5 | 4.0 | -1.5 | 101.8 (3.6) | 84.5 (2.7) |
| | 80 | 4.8 | 4.6 | 3.0 | 97.5 (5.3) | 97.1 (2.6) |
| | 10 | 3.3 | 8.2 | 2.0 | 91.7 (7.8) | 88.6 (5.5) |
| Volkensiflavona | 50 | 9.3 | 10.2 | -3.8 | 97.8 (4.9) | 85.2 (6.5) |
| | 80 | 6.3 | 7.7 | -0.1 | 80.2 (5.0) | 97.1 (4.0) |
| | 10 | 3.7 | 11.1 | 10.5 | 82.3 (8.3) | 93.7 (6.7) |
| Amentoflavona | 50 | 6.9 | 6.8 | 3.1 | 80.3 (1.5) | 87.9 (9.3) |
| | 80 | 8.0 | 5.3 | 5.9 | 79.5 (10.0) | 101.5 (3.4) |
| | 10 | 2.1 | 14.4 | 7.1 | 100.4 (8.8) | 103,7 (2.6) |
| Flavonoides | | | | | | |
| Luteolina | 50 | 0.9 | 11.6 | 9.3 | 108.9 (3.0) | 110,8 (3.2) |
| | 80 | 5.7 | 13.0 | 13.5 | 110.0 (2.2) | 120,3 (3.5) |
| | 10 | 3.0 | 12.0 | 6.4 | 81.1 (6.7) | 96.1 (1.1) |
| Apigenina | 50 | 2.0 | 7.1 | -3.5 | 90.7 (1.8) | 89.4 (3.4) |
| | 80 | 5.6 | 6.7 | 6.6 | 87.4 (4.0) | 96.9 (3.6) |
| | 10 | 8.6 | 9.9 | -0.8 | 92.7 (7.0) | 94.8 (1.3) |
| Naringenina | 50 | 3.1 | 5.0 | -0.01 | 96.5 (5.2) | 93.5 (5.8) |
| | 80 | 3.4 | 3.6 | 5.8 | 83.2 (4.4) | 95.5 (4.0) |
| Estándar interno (IS) | | | | | | |
| Warfarina | 100 | -- | -- | -- | 114.1 (5.4) | 88.1 (2.0) |

Frente al **porcentaje de recuperación** (%R), para todos los analitos y en todos los niveles evaluados se obtuvieron valores por encima del 84.5 % con CV inferiores al 10 %. Vo fue el analito con menor %R y Lu fue el único que alcanzó valores superiores al 100 %. En cuanto a los niveles de concentración no se evidenció ninguna relación existente con él %R. Con respecto al **efecto matriz** (EM) no existe una supresión o aumento significativo de la ionización a causa de interferencias posibles en la matriz que impida un proceso de cuantificación adecuado, y al igual que él %R la variación encontrada (CV) fue menor con respecto al valor límite estipulado (15%). Sin embargo, se destaca que en Am se observa un leve efecto de supresión de la ionización y en Lu un aumento de esta, los cuales podrían estar atribuidos a trazas de interferentes coeluyendo con estos compuestos que directamente en la ESI o en la celda de colisión generan la respectiva supresión o aumento de la ionización. De esta forma los resultados obtenidos confirman que la metodología analítica planteada para la preparación de muestras, usando los cartuchos para la

precipitación de proteínas y eliminación conjunta de fosfolípidos, representa una técnica sencilla, reproducible, robusta para la preparación de muestras a partir de plasma en el análisis de flavonoides y biflavonoides, permitiendo la realización de ensayos: con alto %R, mitigando el EM a causa de una eliminación efectiva de los fosfolípidos, protegiendo la columna y el sistema cromatográfico en el tiempo por la eliminación efectiva de proteínas y la filtración en línea, y por último confiriendo una repetibilidad apreciable en el análisis rutinario de muestras.

Tabla 13. Estabilidad de los flavonoides y biflavonoides en plasma de rata bajo diferentes condiciones

| Compuestos | Nivel (ng/mL) | 4 horas, temperatura ambiente | | 8 horas, 15°C | | 45 días, -20°C | |
|----------------------|---------------|-------------------------------|-----|---------------|------|----------------|-----|
| | | %ER | %CV | %ER | %CV | %ER | %CV |
| Biflavonoides | | | | | | | |
| Morelloflavona | 10 | -10,6 | 5 | 3,3 | 7,9 | 8,8 | 4,4 |
| | 50 | -4 | 1,5 | 3 | 3,1 | -3,3 | 2,6 |
| | 80 | 2,7 | 4,8 | 5,1 | 5,9 | 1,2 | 3,9 |
| Volkensiflavona | 10 | -8,7 | 3,3 | 7,3 | 1,8 | 7,4 | 2,9 |
| | 50 | -3,9 | 9,3 | 5,5 | 6,4 | -13 | 2,8 |
| | 80 | 4,6 | 6,3 | 4,1 | 3,3 | -9 | 2 |
| Amentoflavona | 10 | -8,7 | 3,3 | 7,3 | 1,8 | 7,4 | 2,9 |
| | 50 | -3,9 | 9,3 | 5,5 | 6,4 | -13 | 2,8 |
| | 80 | 4,6 | 6,3 | 4,1 | 3,3 | -9 | 2 |
| Flavonoides | | | | | | | |
| Luteolina | 10 | -9,7 | 2,1 | 3,7 | 3,6 | 12,5 | 4 |
| | 50 | -3,7 | 0,9 | 7,3 | 2,9 | 8,1 | 5,3 |
| | 80 | -0,3 | 5,7 | 9,9 | 2,8 | 13,5 | 5,1 |
| Apigenina | 10 | -9,7 | 2,1 | 3,7 | 3,6 | 12,5 | 4 |
| | 50 | -3,7 | 0,9 | 7,3 | 2,9 | 8,1 | 5,3 |
| | 80 | -0,3 | 5,7 | 9,9 | 2,8 | 14,5 | 5,6 |
| Naringenina | 10 | -4,1 | 8,6 | -4,3 | 10,7 | 6,2 | 9,5 |
| | 50 | 1,1 | 3,1 | -2,6 | 4,5 | 1,5 | 7,4 |
| | 80 | 5,3 | 3,4 | 6,1 | 5,3 | 6 | 3,6 |

En la Tabla 13 se resumen los resultados obtenidos en la evaluación de la **estabilidad** de los compuestos. De forma general todos los analitos son estables bajo las siguientes condiciones: 4 horas a temperatura ambiente simulando el tiempo de preparación de las muestras, 8 horas a 15°C simulando las condiciones y el tiempo de residencia en el automuestreador y por 45 días a -20°C emulando las condiciones de almacenamiento a mediano plazo. Conforme a los resultados obtenidos, se podría plantear que la temperatura ambiente es la condición que más afecta la estabilidad y que por su parte, en los otros dos grupos, los resultados del %ER obtenidos no responden a algún comportamiento sistemático derivado de la condición evaluada, sino más bien que estarían atribuidos a la propia exactitud del método. En cuanto al **carry-over** un efecto memoria atribuible a señales residuales de los analitos tras inyecciones sucesivas. Los resultados obtenidos indican que en ninguno de los analitos existe un efecto considerable. De hecho, a excepción de Mo, no se detectó ningún analito en los blancos de plasma inyectados tras la inyección previa de

un mix de analitos a 100 ng/mL. Para el caso específico de Mo, el efecto residual encontrado correspondiente a la respuesta promedio obtenida en los tres blancos fue inferior al 11.1 % de la respuesta alcanzada a nivel del el LLOQ de este compuesto, por tanto independientemente de su detección, Mo también cumple con el criterio establecido (< 20%).

7.2.3 Estudio farmacocinético de biflavonoides de *G. madruno* y sus flavonoides estructuralmente relacionados

En el análisis de los parámetros farmacocinéticos y la biodisponibilidad de flavonoides administrados por vía oral existen diversas aproximaciones metodológicas. Anteriormente dada la limitación en la sensibilidad de los detectores empleados (UV, fluorescencia y electroquímicos) los estudios debían realizarse principalmente en animales de tamaño medio como: conejos, perros y monos en procura de obtener volúmenes de plasma significativos [158]. Adicionalmente, como es bien conocido en los flavonoides las especies biodisponibles que alcanzan las mayores concentraciones plasmáticas son principalmente los derivados metabólicos producto de reacciones de fase II en enterocitos e hígado, por lo cual el monitoreo a nivel analítico de los compuestos de partida presentes en una fuente natural, representaba un reto analítico significativo, que en muchos casos estas técnicas de detección no tenían la capacidad para abordarlo [162]. De esta forma, la evaluación farmacocinética se realizaba principalmente sobre el monitoreo de los flavonoides totales empleando procesos de hidrólisis enzimáticas o ácidas en el tratamiento de las muestras. Entre los procedimientos más empleados, anteriormente y en la actualidad, se encuentra el uso de enzimas hidrolíticas (glucuronidasa y sulfatasa) de derivados glucuronidados, sulfatados y glucosulfatados. Como principales inconvenientes con esta metodología se encuentran: la falta de reproducibilidad entre estudios por la variabilidad presentada lote a lote en la especificidad y actividad de estas enzimas, y el desconocimiento a nivel cualitativo y cuantitativo de las principales metabolitos conjugados que en términos de concentración alcanzadas podrían ser considerados como las especies bioactivas [252,253].

Hoy por hoy, las ventajas analíticas existentes asociadas con el uso de técnicas sensibles y selectivas como lo es el acople LC-masas tándem, ha promovido la evaluación farmacocinética de flavonoides en una menor escala, permitiendo el uso de especies como ratas y ratones. A su vez, el aumento en la sensibilidad de los métodos y el uso de detectores de masas de alta resolución, ha permitido el análisis de estos compuestos en su forma libre, en conjunto con la determinación exhaustiva de los derivados metabólicos producto de la ingesta de flavonoides en matrices biológicas diversas como plasma, orina, heces, bilis, y distintos tejidos y órganos [162,254]. Sin embargo los resultados encontrados hasta el momento en la evaluación farmacocinética de las formas libres de flavonoides

como luteolina, naringenina, apigenina, quercetina, isoharmentina, entre otros, y biflavonoides como amentoflavona, sugieren que estas formas no son las responsables de la bioactividad. Además de encontrarse en una concentración de hasta 1 a 10 con respecto a los compuestos totales producto de la hidrólisis, la información de los perfiles cinéticos de las agliconas libres no provee información acerca de los diferentes lugares de absorción, posible metabolismo enterohepático, entre otros aspectos de importancia [242,251]. Por tanto, a nivel cuantitativo, el estudio farmacocinético exclusivo de las formas libres podría representar una subestimación de la biodisponibilidad alcanzada, y a nivel cualitativo, los perfiles cinéticos obtenidos podrían carecer de información relevante debido a la rápida transformación metabólica en enterocitos e hígado, impidiendo establecer así, correlaciones significativas entre la bioactividad y la biodisponibilidad. De esta forma, lo ideal sería una evaluación completa en donde se determinen conjuntamente los compuestos libres, los compuestos totales y los principales metabolitos. Sin embargo, la dificultad de encontrar estándares para la evaluación cinética de los metabolitos dificulta su inclusión. En referencia a este trabajo por ejemplo, de los biflavonoides evaluados no se encontraron reportes *in vitro* o *in vivo* que determinen la biodisponibilidad o algún dato cinético de M_o y V_o . Tomando como referencia Am, un estudio reciente indica que a una dosis alta de 300 mg/kg por vía oral, cerca del 93 % de la Am biodisponible proviene de derivados hidrolizados. De hecho los niveles alcanzados de Am libre fueron prácticamente indetectables [242]. Por tal motivo, con el fin de evaluar los parámetros farmacocinéticos de los principales biflavonoides de *G. madruno* y comparar los resultados con los flavonoides estructuralmente relacionados (Na, Lu y Ap), se decidió emplear un procedimiento de hidrólisis enzimático cuantificando en términos de flavonoides totales, que: i) asegurará una concentración significativa de estos compuestos, ii) evitará el uso de dosis elevadas no escalables en ensayos de bioactividad y iii) brindará la mayor información posible conforme a los diferentes procesos farmacocinéticos.

Empleando el método validado por UHPLC MS/MS se realizó el estudio farmacocinético de biflavonoides y flavonoides estructuralmente relacionados de *G. madruno*. La Figura 28 muestra los perfiles obtenidos de concentración plasmática versus tiempo (CP Vs T) de los flavonoides totales Lu (A), Ap (B) y Na (C) y los biflavonoides totales M_o (D y G), V_o (E y H) y Am (F e I) tras la administración vía oral de un mix de flavonoides (columna 1), un mix de biflavonoides (columna 2) y un extracto estandarizado de hojas de *G. madruno* (columna 3) correspondientes a los grupos experimentales 1, 2 y 3 (G1, G2 y G3), respectivamente. Por su parte, para todos analitos los parámetros farmacocinéticos obtenidos bajo un modelo no compartimental (mNC) se resumen en la Tabla 14. A nivel de los biflavonoides, en G2 y G3 M_o alcanzó los mayores valores conforme al $ABC-t_{24}$ y el $ABC-\infty$, seguido de V_o y Am. Estos resultados se correlacionan directamente con la dosis administrada en los diferentes grupos experimentales. Sin embargo, con respecto al ABC normalizado frente a la dosis

administrada (ABC-∞/dosis), el orden encontrado varió en ambos grupos, siendo Vo>Mo>AM. A nivel cinético y en lo que concierne al T_{1/2} y al TMR, Vo fue el biflavonoide que más rápido fue eliminado y Mo el que permaneció por mayor tiempo en el organismo.

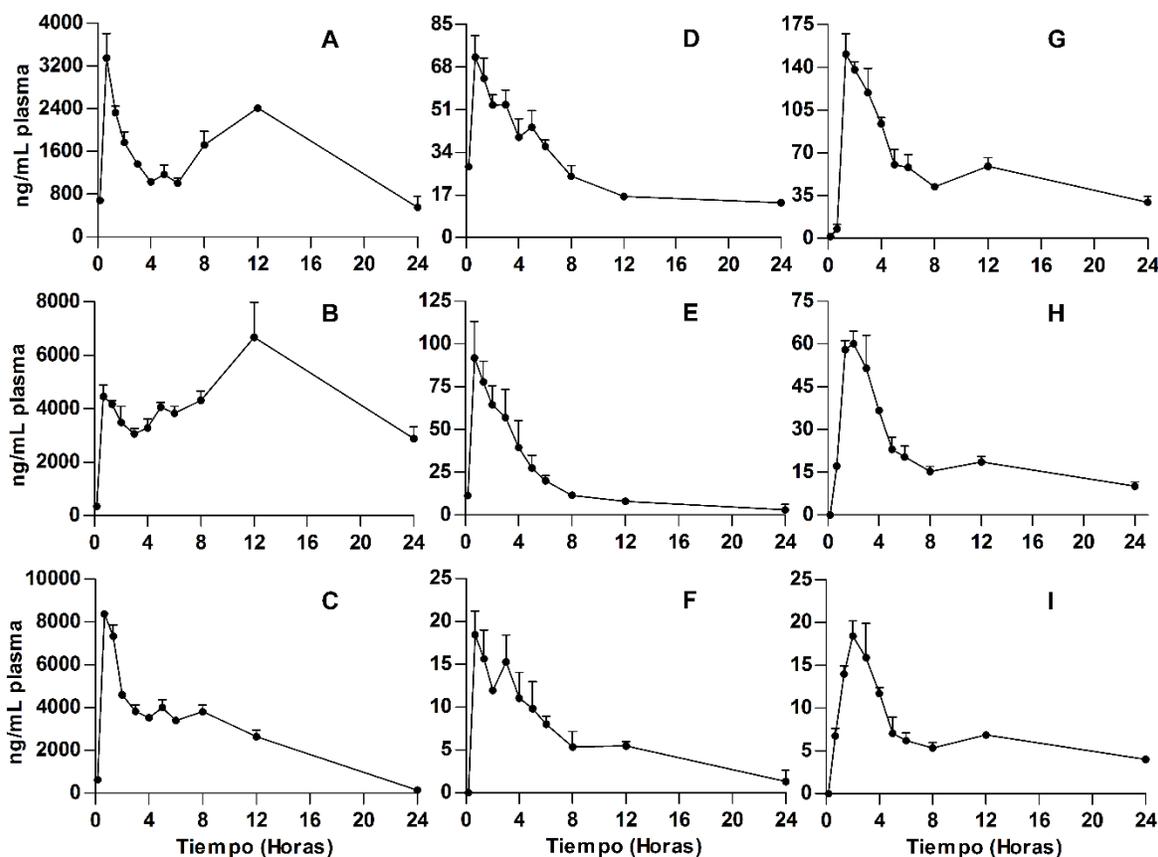


Figura 28. Perfiles de concentración plasmática versus tiempo de biflavonoides y flavonoides totales obtenidos en plasma de rata tras la administración única por vía oral de un mix de flavonoides, biflavonoides y un extracto estandarizado de hojas de *G. madruno*. La primera columna corresponde a los resultados obtenidos para el grupo 1 tras la administración de un mix de luteolina (A), Apigenina (B) y Naringenina (C); la segunda columna corresponde a los resultados obtenidos para el grupo 2 tras la administración de un mix de morelloflavona (D), volkensiflavona (E) y amentoflavona (F); y la tercera columna corresponde a los resultados obtenidos para el grupo 3 tras la administración del extracto estandarizado de hojas de *G. madruno* para los biflavonoides morelloflavona (G), volkensiflavona (H) y amentoflavona (I).

Adicionalmente, los biflavonoides presentan perfiles similares intra-grupos y difieren significativamente entre-grupos (Figura 28). Tras una administración de los compuestos puros (Figura 28 D, E y F, G2), los biflavonoides presentaron una absorción rápida con un Tmax en un rango entre 0.42 y 1.06 horas, siendo Am el compuesto que más rápido fue absorbido, seguido de Vo y Mo. De manera evidente Am y en menor medida Vo y Mo, a un tiempo de 3 horas presentaron un segundo máximo de absorción que de acuerdo a lo reportado para Am en estudios en ratas y en humanos, podría deberse a un ciclo

enterohepático a causa del retorno de metabolitos conjugados por vía biliar, desde el hígado hacia el intestino, generando un segundo C_{max} tras su respectiva reabsorción [251,255]. Sin embargo estudios recientes no muestran este comportamiento [242] y conforme al conocimiento de los flavonoides, no se ha podido refutar este evento pero de existir constituye un proceso minoritario [254,256]. Siendo así, la aparición de segundos máximos de absorción podría atribuirse a diferentes eventos como circulación enterohepática, transformación de compuestos en el TGI y/o dobles sitios de absorción.

Tabla 14. Parámetros farmacocinéticos de biflavonoides y flavonoides totales tras la administración oral de un mix de flavonoides, biflavonoides y un extracto estandarizado de hojas de *G. madruno*

| Analito | Grupo | Dosis (mg/kg) | ABC-t ₂₄ (ng/h mL) | ABC-∞ (ng/h mL) | ABC-∞/dosis | T _{1/2} (h) | TMR-t ₂₄ (h) | T _{max} (h) | C _{max} (ng/mL) |
|---------|-------|---------------|-------------------------------|-----------------|-------------|----------------------|-------------------------|----------------------|--------------------------|
| Na | G1 | 20 | 63774±7661 | 64714±7768 | 8404±1009 | 4,05±0,09 | 7,23±0,36 | 0,35±0,02 | 8759,9±279,0 |
| Lu | G1 | 20 | 38037±3063 | 39628±4031 | 5147±524 | 2,09±0,37 | 10,02±0,73 | 0,39±0,02 | 3600,1±868,9 |
| Ap | G1 | 20 | 108226±15144 | 122615±13273 | 15924±1724 | 3,55±0,54 | 11,58±0,61 | 0,42±0,03 | 4640,2±778,4 |
| Mo | G2 | 30,1 | 615±86 | 726±90 | 58±7 | 5,58±0,49 | 8,49±0,31 | 1,06±0,21 | 77,0±16,0 |
| Vo | G2 | 13,1 | 434±113 | 462±117 | 109±28 | 2,39±0,54 | 4,50±0,58 | 0,63±0,07 | 96,7±38,5 |
| Am | G2 | 13,5 | 147±45 | 182±55 | 37±11 | 4,38±1,25 | 6,32±0,86 | 0,42±0,05 | 19,1±4,8 |
| Mo | G3 | 31,8 | 1361±45 | 1510±112 | 120±9 | 3,37±0,55 | 9,49±0,25 | 1,67±0,14 | 121,8±17,4 |
| Vo | G3 | 8,1 | 498±40 | 540±51 | 168±16 | 2,82±0,15 | 8,82±0,49 | 1,38±0,14 | 61,9±5,6 |
| Am | G3 | 4,3 | 168±27 | 187±29 | 110±17 | 3,39±0,19 | 9,54±0,16 | 1,27±0,10 | 19,9±3,2 |

Los resultados obtenidos de los biflavonoides en G3 también presentaron dos máximos de absorción, pero a diferencia de G2, el segundo máximo no es tan pronunciado y se produce a un tiempo cercano a 12 horas, 9 horas después del presentado tras la administración de los biflavonoides puros (G2). En este caso, un posible ciclo enterohepático es prácticamente improbable. Por tanto, la absorción en distintas partes del TGI y la transformación de compuestos se constituyen como los principales mecanismos que explican este comportamiento al administrar los biflavonoides contenidos en un extracto estandarizado. En el caso de Mo y Vo (Figura 28 G y H), la presencia en el extracto de cantidades significativas de derivados glicosidados de estos compuestos (Fu, Es y Ma, por ejemplo), conlleva a postular a la hidrólisis de estos glicósidos por enzimas intestinales y por la microbiota como el mecanismo probable que explique el segundo proceso de absorción de Mo y Vo tras la liberación de las respectivas agliconas y su respectiva absorción. Adicionalmente el ABC-∞/dosis obtenido para Mo y Vo fue superior tras la administración del extracto en comparación con la administración de los compuestos puros, reafirmando así la importancia de estos glicósidos. De hecho, específicamente Vo en el G2 obtuvo una C_{max} 1.6 veces mayor a la obtenida en G3, pero el ABC-∞/dosis fue 1.5 veces menor

respecto a G3. A nivel gráfico esto se evidencia en el ancho del primer máximo de absorción y en la presencia del segundo (Figura 28E y H) y a nivel cinético, en el aumento del TMR de los biflavonoides administrados en el extracto estandarizado.

En el caso de Am, en ambos grupos experimentales se evidenció un proceso de absorción a un $t=12$ h (Figura 28 F e I). Teniendo presente que en el análisis cromatográfico del extracto no se encontraron derivados glicosidados de Am, este aumento en la concentración plasmática estaría atribuido a la absorción de Am libre y/o conjugados en partes terminales del intestino delgado y en el colon. Este proceso ya ha sido descrito en ratas, en otros estudios farmacocinéticos de flavonoides como kaempferol, quercetina, luteolina, apigenina y en la misma amentoflavona [244,245,251]. Adicionalmente, cabe resaltar que la administración de Am a través del extracto mejoró en alrededor de tres veces el ABC- ∞ /dosis con respecto a los resultados obtenidos en G2, por lo tanto al descartar otras fuentes de Am en el extracto, el aumento del ABC- ∞ /dosis estaría determinado posiblemente por interacciones de algunos de los componentes del extracto, inhibiendo o saturando transportadores de eflujo, rutas metabólicas, entre otros proceso involucrados en disminuir la biodisponibilidad de este tipo de moléculas.

En cuanto a los resultados obtenidos de los flavonoides (Lu, Ap y Na) monómeros constitucionales de los biflavonoides Mo, Vo y Am, es evidente un aumento de la biodisponibilidad de los flavonoides con respecto a los biflavonoides en algunos casos alcanzado ABC- ∞ /dosis 100 veces mayores (Tabla 14). El comportamiento general de los flavonoides encontrado se asemeja a lo reportado previamente [244,245,251,257], siendo Ap el flavonoide con mayor ABC, seguido de Na y Lu. Sin embargo, la disminución de la biodisponibilidad de Lu con respecto a Ap y Na podría ser relativa, ya que el grupo catecol en el anillo C de este compuesto, recientemente ha sido reconocido como un sustrato de la enzima COMT (catecol-O-metiltransferasa), que como producto metabólico produce dos flavonoides metilados naturales no hidrolizables bajo las condiciones establecidas en la preparación de muestras (diosmetina y crisoeriol) [257,258]. Esta condición podría extrapolarse a los biflavonoides, explicando así, las diferencias encontradas entre Vo y Mo, abriendo la posibilidad de encontrarse *in vivo* biflavonoides tipo 3-8"-naringenil-diosmetina y 3-8"-naringenil-crisoeriol derivados de la administración de Mo. Si bien Ap fue el flavonoide que mayor ABC- ∞ /dosis presentó, en el caso de los biflavonoides este resultado no se extrapoló a la Am (3'-8"-biapigenina), a diferencia Vo (3-8"-naringenilapigenina) fue el biflavonoide con mayor biodisponibilidad. Por tanto sería importante evaluar el rol que ejerce el tipo de enlace interflavonoide en los procesos asociados con la biodisponibilidad de estos compuestos.

Cabe resaltar que esta es la primera aproximación al conocimiento de la biodisponibilidad y los procesos farmacocinéticos de los principales biflavonoides de *G. madruno*,

constituyéndose el primer reporte para Mo y Vo. Así mismo la comparación entre flavonoides y biflavonoides relacionados permitió establecer que existen diferencias muy significativas en la biodisponibilidad de estos compuestos. De esta forma, el aumento del peso molecular y el número de hidroxilos entre flavonoides y biflavonoides estaría atribuido a una disminución en la permeabilidad de estos últimos. Por lo tanto, en procura de mantener la bioactividad encontrada hasta el momento, será necesario implementar estrategias desde la tecnología farmacéutica que mejoren los procesos de permeabilidad y así contribuyan a un aumento de la biodisponibilidad de los biflavonoides. Como punto de partida, es destacable que la biodisponibilidad de los biflavonoides se ve mejorada cuando estos son administrados a través del extracto, por lo cual el extracto de hojas de *G. madruno* desarrollado, se constituye como el precursor ideal para dicha optimización continuando en la línea del desarrollo de ingredientes bioactivos accesibles basados en biflavonoides de *G. madruno*. Otro camino importante que queda por aclarar es determinar las principales especies metabólicas biodisponibles producto de la administración de biflavonoides de *G. madruno*, ya que si bien los resultados encontrados en este trabajo indican que los biflavonoides libres, glucoronidados y sulfatados se encuentran en concentraciones que podrían considerarse como subterapéuticas, un estudio demostró que la administración de Mo por 6 meses, vía oral a una dosis de 4 mg/kg lograba tener un efecto ateroprotector en un modelo transgénico en ratones [143], tomando fuerza la posibilidad que las especies activas procedan de metabolitos no contemplados en este trabajo que alcancen concentraciones significativas.

8 CONCLUSIONES

Bajo el abordaje metodológico empleado, se desarrolló y validó el primer método cromatográfico por HPLC-DAD-MS para la cuantificación e identificación de biflavonoides en hojas, tallos, epicarpio, mesocarpio y semillas de *G. madruno*. De forma general se logró cuantificar 4 biflavonoides (fukugisido, moreloflavona, volkensiflavona y amentoflavona), e identificar mediante HPLC-MS y estudios de hidrolisis tres compuestos hidrolizables derivados de moreloflavona y volkensiflavona y una biflavanona. La identificación tentativa de estos biflavonoides correspondió a: i) espicatasido (volkensiflavona-7-O-glucósido), ii) madrunoudeasido (Moreloflavona-7-O-acetilglucosido, iii) volkensiflavona-O-acetilglucosido; y IV) al biflavonoide GB-2a (3-8"-naringenileriodictiol).

Con respecto al contenido de biflavonoides en *G. madruno*, las hojas del madroño representan una fuente abundante y diversa de biflavonoides, pero es el epicarpio el que se constituye como la fuente más representativa de moreloflavona y fukugisido alcanzando valores superiores al 10 % de contenido de biflavonoides totales en el material seco. Por otro lado, el contenido de biflavonoides totales es sub-estimado en todas las matrices ya que existen principalmente glicósidos de moreloflavona y volkensiflavona identificados y no cuantificados presentes en cada una de ellas. De esta forma, los resultados a nivel cuantitativo proponen a *G. madruno* como una especie referente del género *Garcinia* en la expresión de biflavonoides tipo moreloflavona, convirtiéndola de esta forma en una materia prima óptima para el desarrollo de productos basados en estos compuestos.

Mediante un abordaje sistemático basado en diseños de experimentos en procura de maximizar la extracción de biflavonoides de las respectivas matrices y minimizar la extracción conjunta de compuestos diluyentes e interferentes, se logró desarrollar un proceso de extracción, sencillo, eficiente y amigable con el medio ambiente, que permitió aumentar en 15.6, 14.1, 6.7, 4.9 y 4.1 veces el contenido de biflavonoides totales en las matrices semillas, mesocarpio, tallos, hojas y epicarpio, respectivamente. Se postula en especial a los extractos de hojas y epicarpio como posibles ingredientes bioactivos con hasta un 50% de biflavonoides. Se establece de esta forma el punto de partida para el desarrollo de productos de valor, en vista de las potencialidades encontradas hasta el momento de los biflavonoides en la prevención y tratamiento de algunas ENT.

Los extractos optimizado obtenidos a partir *G. madruno* presentan una actividad antioxidante significativa, la cual está explicada en su mayoría por el contenido de biflavonoides, especialmente moreloflavona y fukugisido, los cuales además de ser los biflavonoides mayoritarios, son los que mayor actividad presentan en los mecanismos evaluados, siendo SPLET el mecanismo antioxidante predominante de los biflavonoides.

El resultado del estudio REA-antioxidante mediante el mecanismo SET (FRAP), confirma como aspectos estructurales relevantes al grupo catecol, seguido del doble enlace entre el carbono 2 y 3 y finalmente al hidroxilo en posición 3. En relación al acople flavonoide-flavonoide, se observa un antagonismo derivado probablemente de un impedimento estérico que impide la reducción efectiva del complejo $[\text{Fe}-(\text{TPTZ})_2]^{3+}$. Frente a los resultados del mecanismo SPLET (ORAC), no fue posible establecer una relación estructural consistente a nivel de los grupos funcionales, sin embargo quedó demostrado que los flavonoides en general alcanzan una actividad antioxidante entre 3 a 11 veces superior a la presentada por el Trolox y que en el caso específico de morelloflavona y fukugisido, sí existe un efecto sinérgico producto del enlace interflavonoide.

Finalmente a nivel de la biodisponibilidad y el conocimiento farmacocinético de los biflavonoides de *G. madruno*, la metodología analítica desarrollada se constituye como un método aplicable para el desarrollo de un estudio farmacocinético mediante la cuantificación de biflavonoides y flavonoides totales en plasma. Así mismo, los resultados obtenidos representan los primeros reportes para los compuestos M_o y V_o y el primer estudio en donde se comparan biflavonoides frente a los flavonoides constitucionales. Producto de esta comparación, se evidenció que el enlace interflavonoide disminuye drásticamente la biodisponibilidad, por lo cual se hace necesario proponer metodologías en procura de mejorar esta condición. Así mismo se requiere establecer un conocimiento más profundo de las especies biodisponibles producto de la ingesta de estos compuestos, en procura de establecer correlaciones significativas entre la biodisponibilidad y la bioactividad de los biflavonoides.

9 PERSPECTIVAS

Las actividades derivadas producto de este trabajo son diversas. Actualmente se encuentra en ejecución la evaluación de los principales metabolitos biodisponibles de los biflavonoides evaluados en los dos máximos de absorción, así como un estudio de efectividad vía oral del extracto de hojas desarrollado en el modelo triple transgénico de la enfermedad de Alzheimer.

A corto plazo, se plantea evaluar el efecto ateroprotector del extracto administrado vía oral en el modelo animal apoE^{-/-}. Así mismo, se están escribiendo propuestas en procura de conseguir recursos para la adquisición de una planta piloto basada en procesos de extracción limpios aplicable a la generación de ingredientes de *G. madruno* de calidad alimentaria y farmacéutica. También se plantea la ejecución de una expedición “*G. madruno*” que permita determinar los principales nichos productivos en nuestro territorio y en conjunto contribuya a determinar la variabilidad química conforme a la expresión de biflavonoides en diferentes especímenes y regiones del país

A mediano plazo se plantea el escalado del proceso de extracción acompañado de la ejecución de estrategias desde la tecnología farmacéutica en procura de mejorar la biodisponibilidad de los biflavonoides. Finalmente basados en estudios de factibilidad y vigilancia tecnológica se pondría a disposición la implementación de estrategias para la protección intelectual y el registro de marca de los ingredientes derivados de *G. madruno* más promisorios en busca de una futura comercialización e inclusión en formulaciones farmacéuticas y/o alimentarias.

10 REFERENCIAS

- [1] World Health Organization, Global status report on noncommunicable diseases (2011). http://www.who.int/nmh/publications/ncd_report2010/en/ (accessed March 29, 2014).
- [2] R. Lozano, M. Naghavi, K. Foreman, S. Lim, K. Shibuya, V. Aboyans, et al., Global and regional mortality from 235 causes of death for 20 age groups in 1990 and 2010: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2010., *Lancet*. 380 (2012) 2095–128.
- [3] World Health Organization, Noncommunicable Diseases Country profile 2011, (2011).
- [4] I. Arroyave, A. Burdorf, D. Cardona, M. Avendano, Socioeconomic inequalities in premature mortality in Colombia, 1998-2007: the double burden of non-communicable diseases and injuries., *Prev. Med. (Baltim)*. 64 (2014) 41–7.
- [5] G.O. Matheson, M. Klügl, L. Engebretsen, F. Bendiksen, S.N. Blair, M. Börjesson, et al., Prevention and management of non-communicable disease: the IOC consensus statement, Lausanne 2013., *Br. J. Sports Med.* 47 (2013) 1003–11.
- [6] N.M. Probst-Hensch, Chronic age-related diseases share risk factors: do they share pathophysiological mechanisms and why does that matter?, *Swiss Med. Wkly*. 140 (2010) w13072.
- [7] L. Hogg, A. Watt, Overcoming the stigma of dementia World Alzheimer Report 2012, (2012).
- [8] World Health Organization, Prevent Chronic Diseases a vital investment: WHO global Report, (2005).
- [9] P. Zhang, X. Zhang, J. Brown, D. Vistisen, R. Sicree, J. Shaw, et al., Global healthcare expenditure on diabetes for 2010 and 2030., *Diabetes Res. Clin. Pract.* 87 (2010) 293–301.
- [10] D. Stuckler, Population causes and consequences of leading chronic diseases: a comparative analysis of prevailing explanations., *Milbank Q.* 86 (2008) 273–326.
- [11] R.M. Davis, Advances in managing chronic disease, *BMJ*. 320 (2000) 525–526.
- [12] S. Saeidnia, M. Abdollahi, Toxicological and pharmacological concerns on oxidative stress and related diseases., *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 273 (2013) 442–55.
- [13] S. Cahill-Smith, J.-M. Li, Oxidative stress, redox signalling and endothelial dysfunction in ageing-related neurodegenerative diseases: a role of NADPH oxidase 2, *Br. J. Clin. Pharmacol.* 78 (2014) 441–453.
- [14] C. Cencioni, F. Spallotta, F. Martelli, S. Valente, A. Mai, A.M. Zeiher, et al., Oxidative stress and epigenetic regulation in ageing and age-related diseases., *Int. J. Mol. Sci.* 14 (2013) 17643–63.
- [15] D.P. Hajjar, A.M. Gotto, Biological relevance of inflammation and oxidative stress in the pathogenesis of arterial diseases., *Am. J. Pathol.* 182 (2013) 1474–81.
- [16] World Health Organization, Global health risks: Mortality and burden of disease attributable to selected major risks, (2009).
- [17] N. Probst-Hensch, M. Tanner, C. Kessler, C. Burri, N. Künzli, Prevention--a cost-effective way to fight the non-communicable disease epidemic: an academic perspective of the United Nations High-level NCD Meeting., *Swiss Med. Wkly*. 141 (2011) w13266.
- [18] R. Thanan, S. Oikawa, Y. Hiraku, S. Ohnishi, N. Ma, S. Pinlaor, et al., Oxidative Stress and Its Significant Roles in Neurodegenerative Diseases and Cancer., *Int. J. Mol. Sci.* 16 (2014) 193–217.
- [19] M. Rosini, E. Simoni, A. Milelli, A. Minarini, C. Melchiorre, Oxidative stress in Alzheimer's disease: are we connecting the dots?, *J. Med. Chem.* 57 (2014) 2821–31.

- [20] Y.-T. Chang, W.-N. Chang, N.-W. Tsai, C.-C. Huang, C.-T. Kung, Y.-J. Su, et al., The roles of biomarkers of oxidative stress and antioxidant in Alzheimer's disease: a systematic review., *Biomed Res. Int.* 2014 (2014) 182303.
- [21] X. Wang, W. Wang, L. Li, G. Perry, H. Lee, X. Zhu, Oxidative stress and mitochondrial dysfunction in Alzheimer's disease., *Biochim. Biophys. Acta.* 1842 (2014) 1240–7.
- [22] S.R. Subramaniam, M.-F. Chesselet, Mitochondrial dysfunction and oxidative stress in Parkinson's disease., *Prog. Neurobiol.* 106-107 (2013) 17–32. d
- [23] J.M. Taylor, B.S. Main, P.J. Crack, Neuroinflammation and oxidative stress: co-conspirators in the pathology of Parkinson's disease., *Neurochem. Int.* 62 (2013) 803–19.
- [24] Y.-W. Kim, X.Z. West, T. V. Byzova, Inflammation and oxidative stress in angiogenesis and vascular disease., *J. Mol. Med. (Berl).* 91 (2013) 323–8.
- [25] H. Li, S. Horke, U. Förstermann, Oxidative stress in vascular disease and its pharmacological prevention., *Trends Pharmacol. Sci.* 34 (2013) 313–9.
- [26] F. Holguin, Oxidative stress in airway diseases., *Ann. Am. Thorac. Soc.* 10 Suppl (2013) S150–7.
- [27] R. Pandey, M. Singh, U. Singhal, K.B. Gupta, S.K. Aggarwal, Oxidative/Nitrosative stress and the pathobiology of chronic obstructive pulmonary disease., *J. Clin. Diagn. Res.* 7 (2013) 580–8.
- [28] H.M. Mamudu, J.S. Yang, T.E. Novotny, UN resolution on the prevention and control of non-communicable diseases: an opportunity for global action., *Glob. Public Health.* 6 (2011) 347–53.
- [29] R. Smith, Why we should emphasise prevention over treatment of non-communicable disease., *BMJ.* 343 (2011) d4888.
- [30] K.B. Pandey, S.I. Rizvi, Plant polyphenols as dietary antioxidants in human health and disease., *Oxid. Med. Cell. Longev.* 2 (2009) 270–8.
- [31] L. Pham-Huy, H. He, C. Pham-Huy, Free radicals, antioxidants in disease and health, *Int. J. Biomed. Sci.* 4 (2008) 89–96.
- [32] D. Li, Effect of the vegetarian diet on non-communicable diseases., *J. Sci. Food Agric.* 94 (2014) 169–73.
- [33] R. Rodrigo, M. Libuy, F. Feliu, D. Hasson, Polyphenols in Disease: from Diet to Supplements, *Curr. Pharm. Biotechnol.* 15 (2014) 304–317. d
- [34] B. Romano, E. Pagano, V. Montanaro, A.L. Fortunato, N. Milic, F. Borrelli, Novel insights into the pharmacology of flavonoids, *Phyther. Res.* 27 (2013) 1588–1596.
- [35] E.P. Cherniack, Polyphenols: planting the seeds of treatment for the metabolic syndrome., *Nutrition.* 27 (2011) 617–23.
- [36] J.M. Assini, E.E. Mulvihill, M.W. Huff, Citrus flavonoids and lipid metabolism., *Curr. Opin. Lipidol.* 24 (2013) 34–40.
- [37] E. Nicolle, F. Suard, P. Faure, A. Boumendjel, Flavonoids as Promising Lead Compounds in Type 2 Diabetes Mellitus: Molecules of Interest and Structure-Activity Relationship, *Curr. Med. Chem.* 18 (2011) 2661–2672.
- [38] K. Bisht, K.-H. Wagner, A.C. Bulmer, Curcumin, resveratrol and flavonoids as anti-inflammatory, cyto- and DNA-protective dietary compounds., *Toxicology.* 278 (2010) 88–100.
- [39] M.-H. Pan, C.-S. Lai, C.-T. Ho, Anti-inflammatory activity of natural dietary flavonoids., *Food Funct.* 1 (2010) 15–31.
- [40] A. García-Lafuente, E. Guillamón, A. Villares, M. a Rostagno, J.A. Martínez, Flavonoids as anti-inflammatory agents: implications in cancer and cardiovascular disease., *Inflamm. Res.* 58 (2009) 537–52.
- [41] E.J. Osorio, Búsqueda de sustancias bioactivas a partir de dos especies de la flora colombiana: alcaloides de "Phaedranassa dubia"(Amaryllidaceae) y biflavonoides de *Garcinia madruno* (clusiaceae).", Universidad de Barcelona, (2008).

- [42] E. Osorio, J. Londoño, J. Bastida, Low-density lipoprotein (LDL)-antioxidant biflavonoids from *Garcinia madruno*., *Molecules*. 18 (2013) 6092–100.
- [43] R. Hirano, W. Sasamoto, A. Matsumoto, H. Itakura, O. Igarashi, K. Kondo, Antioxidant ability of various flavonoids against DPPH radicals and LDL oxidation., *J. Nutr. Sci. Vitaminol. (Tokyo)*. 47 (2001) 357–62.
- [44] J.M. Davis, E.A. Murphy, M.D. Carmichael, Effects of the dietary flavonoid quercetin upon performance and health., *Curr. Sports Med. Rep.* 8 (2009) 206–13.
- [45] J.-S. Choi, J.-Y. Bae, D.S. Kim, J. Li, J.-L. Kim, Y.-J. Lee, et al., Dietary compound quercitrin dampens VEGF induction and PPAR γ activation in oxidized LDL-exposed murine macrophages: association with scavenger receptor CD36., *J. Agric. Food Chem.* 58 (2010) 1333–41.
- [46] O.J. Lara, Los biflavonoides de *Garcinia madruno* modulan eventos claves del proceso aterogénico, Universidad de Antioquia, (2011).
- [47] J.H. Tabares, Efecto ateroprotector in vivo de biflavonoides de *Garcinia madruno*, Universidad de Antioquia, (2012).
- [48] A. Sabogal, Efecto Neuroprotector de la quercetina y una fracción biflavonoide de *Garcinia madruno* en un modelo triple transgénico para la enfermedad de alzheimer, Universidad de Antioquia, (2014).
- [49] M. Gomberg, An instance of trivalent carbon: triphenylmethyl, *J. Am. Chem. Soc.* 22 (1900) 757–771.
- [50] B. Commoner, J. Townsend, G.E. Pake, Free Radicals in Biological Materials, *Nature*. 174 (1954) 689–691.
- [51] D. Harman, Origin and evolution of the free radical theory of aging: a brief personal history, 1954–2009., *Biogerontology*. 10 (2009) 773–81.
- [52] S.I. Liochev, Reactive oxygen species and the free radical theory of aging., *Free Radic. Biol. Med.* 60 (2013) 1–4.
- [53] J. Viña, C. Borras, K.M. Abdelaziz, R. Garcia-Valles, M.C. Gomez-Cabrera, The free radical theory of aging revisited: the cell signaling disruption theory of aging., *Antioxid. Redox Signal.* 19 (2013) 779–87.
- [54] V.I. Lushchak, Free radicals, reactive oxygen species, oxidative stress and its classification, *Chem. Biol. Interact.* 224 (2014) 164–175.
- [55] M. Gutowski, S. Kowalczyk, A study of free radical chemistry: their role and pathophysiological significance., *Acta Biochim. Pol.* 60 (2013) 1–16.
- [56] I. Batinić-Haberle, J.S. Rebouças, I. Spasojević, Superoxide dismutase mimics: chemistry, pharmacology, and therapeutic potential., *Antioxid. Redox Signal.* 13 (2010) 877–918.
- [57] S. Miyamoto, G.R. Martinez, M.H.G. Medeiros, P. Di, Biology Singlet molecular oxygen generated by biological hydroperoxides, *J. Photochem. Photobiol. B Biol.* 139 (2014) 24–33.
- [58] W. Adam, D. V. Kazakov, V.P. Kazakov, Singlet-oxygen chemiluminescence in peroxide reactions, *Chem. Rev.* 105 (2005) 3371–3387.
- [59] T.P. a Devasagayam, J.P. Kamat, Biological significance of singlet oxygen., *Indian J. Exp. Biol.* 40 (2002) 680–692.
- [60] A. Valavanidis, T. Vlachogianni, K. Fiotakis, S. Loidas, Pulmonary oxidative stress, inflammation and cancer: Respirable particulate matter, fibrous dusts and ozone as major causes of lung carcinogenesis through reactive oxygen species mechanisms, *Int. J. Environ. Res. Public Health*. 10 (2013) 3886–3907.
- [61] C.R. Reczek, N.S. Chandel, ROS-dependent signal transduction., *Curr. Opin. Cell Biol.* 33 (2014) 8–13.
- [62] H. Li, S. Horke, Vascular oxidative stress, nitric oxide and atherosclerosis, *Atherosclerosis*. 237 (2014) 208–219.

- [63] M. Ott, V. Gogvadze, S. Orrenius, B. Zhivotovsky, Mitochondria, oxidative stress and cell death, *Apoptosis*. 12 (2007) 913–922.
- [64] A. Hernández-Aguilera, A. Rull, E. Rodríguez-Gallego, M. Riera-Borrull, F. Luciano-Mateo, J. Camps, et al., Mitochondrial dysfunction: A basic mechanism in inflammation-related non-communicable diseases and therapeutic opportunities, *Mediators Inflamm*. 2013 (2013).
- [65] V.P. Skulachev, Mitochondria-targeted antioxidants as promising drugs for treatment of age-related brain diseases, *J. Alzheimer's Dis*. 28 (2012) 283–289.
- [66] C.E. Griguer, C.R. Oliva, E.E. Kelley, G.I. Giles, J.R. Lancaster, G.Y. Gillespie, Xanthine oxidase-dependent regulation of hypoxia-inducible factor in cancer cells, *Cancer Res*. 66 (2006) 2257–2263.
- [67] J. Nanduri, D.R. Vaddi, S. a. Khan, N. Wang, V. Makerenko, N.R. Prabhakar, Xanthine Oxidase Mediates Hypoxia-Inducible Factor-2 α Degradation by Intermittent Hypoxia, *PLoS One*. 8 (2013) 1–9.
- [68] K. Brieger, S. Schiavone, F.J. Miller, K.-H. Krause, Reactive oxygen species: from health to disease., *Swiss Med. Wkly*. 142 (2012) w13659.
- [69] D. Trachootham, J. Alexandre, P. Huang, Targeting cancer cells by ROS-mediated mechanisms: a radical therapeutic approach?, *Nat. Rev. Drug Discov*. 8 (2009) 579–91.
- [70] R. Radi, Peroxynitrite, a stealthy biological oxidant, *J. Biol. Chem*. 288 (2013) 26464–26472.
- [71] J. Kodydková, L. Vávrová, M. Kocík, a Zák, Human catalase, its polymorphisms, regulation and changes of its activity in different diseases., *Folia Biol. (Praha)*. 60 (2014) 153–67.
- [72] H.N. Kirkman, G.F. Gaetani, Mammalian catalase: a venerable enzyme with new mysteries, *Trends Biochem. Sci*. 32 (2007) 44–50.
- [73] V.I. Lushchak, Glutathione homeostasis and functions: potential targets for medical interventions, *J. Amino Acids*. 2012 (2012) 736837.
- [74] H. Sies, Oxidative stress: a concept in redox biology and medicine., *Redox Biol*. 4 (2015) 180–183.
- [75] H. Sies, *Oxidative Stress*, Elsevier, (1985).
- [76] H. Sies, D. Jones, *Encyclopedia of Stress*, Elsevier, (2007).
- [77] T. Finkel, Signal transduction by reactive oxygen species, *J. Cell Biol*. 194 (2011) 7–15.
- [78] H. Erdamar, H. Demirci, H. Yaman, M.K. Erbil, T. Yakar, B. Sancak, et al., The effect of hypothyroidism, hyperthyroidism, and their treatment on parameters of oxidative stress and antioxidant status., *Clin. Chem. Lab. Med*. 46 (2008) 1004–10.
- [79] L. Mauch, A. Lun, M.R.G. O'Gorman, J.S. Harris, I. Schulze, A. Zychlinsky, et al., Chronic granulomatous disease (CGD) and complete myeloperoxidase deficiency both yield strongly reduced dihydrorhodamine 123 test signals but can be easily discerned in routine testing for CGD., *Clin. Chem*. 53 (2007) 890–6.
- [80] B.R. Scott, K.M. Slattery, B.J. Dascombe, Intermittent hypoxic resistance training: Is metabolic stress the key moderator?, *Med. Hypotheses*. 84 (2015) 145–9.
- [81] L.Y. Tanaka, L.R.G. Bechara, A.M. dos Santos, C.P. Jordão, L.G.O. de Sousa, T. Bartholomeu, et al., Exercise improves endothelial function: A local analysis of production of nitric oxide and reactive oxygen species, *Nitric Oxide*. 45 (2015) 7–14.
- [82] B.K.H. Tan, K.W. Ong, Influence of Dietary Polyphenols on Carbohydrate Metabolism, in: *Polyphenols Hum. Heal. Dis.*, (2013): pp. 95–111.
- [83] A. Scalbert, I.T. Johnson, M. Saltmarsh, Polyphenols: antioxidants and beyond., *Am. J. Clin. Nutr*. 81 (2005) 215S–217S.
- [84] F. Visioli, C.A. De La Lastra, C. Andres-Lacueva, M. Aviram, C. Calhau, A. Cassano, et al., Polyphenols and human health: a prospectus., *Crit. Rev. Food Sci. Nutr*. 51 (2011) 524–46.

- [85] K. Conrad, R. Watson, Polyphenols and Public Health, in: Polyphenols Hum. Heal. Dis., Elsevier, (2014): pp. 9–15.
- [86] R.S. Gold, K.R. Miner, Report of the 2000 Joint Committee on Health Education and Promotion Terminology, *J. Sch. Health.* 72 (2002) 3–7.
- [87] A. Scalbert, C. Manach, C. Morand, C. Rémésy, L. Jiménez, Dietary polyphenols and the prevention of diseases., *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* 45 (2005) 287–306.
- [88] R.H. Friis, *Epidemiology* 101, 2010.
- [89] F. Thielecke, M. Boschmann, The potential role of green tea catechins in the prevention of the metabolic syndrome - A review, *Phytochemistry.* 70 (2009) 11–24.
- [90] I.C.W. Arts, P.C.H. Hollman, Polyphenols and disease risk in epidemiologic studies., *Am. J. Clin. Nutr.* 81 (2005) 317S–325S.
- [91] F. Sofi, F. Cesari, R. Abbate, G.F. Gensini, A. Casini, Adherence to Mediterranean diet and health status: meta-analysis., *BMJ.* 337 (2008) a1344.
- [92] J.O. Drife, *New England journal, BMJ Br. Med. J.* 318 (1999) 1565.
- [93] D. Grassi, C. Ferri, Cocoa, Flavonoids and Cardiovascular Protection, in: Polyphenols Hum. Heal. Dis., Elsevier, (2014): pp. 1009–1023.
- [94] D. Taubert, R. Roesen, C. Lehmann, N. Jung, E. Schömig, Effects of low habitual cocoa intake on blood pressure and bioactive nitric oxide: a randomized controlled trial., *JAMA.* 298 (2007) 49–60.
- [95] S. Desch, D. Kobler, J. Schmidt, M. Sonnabend, V. Adams, M. Sareban, et al., Low vs. higher-dose dark chocolate and blood pressure in cardiovascular high-risk patients., *Am. J. Hypertens.* 23 (2010) 694–700.
- [96] M.B. Engler, M.M. Engler, C.Y. Chen, M.J. Malloy, A. Browne, E.Y. Chiu, et al., Flavonoid-Rich Dark Chocolate Improves Endothelial Function and Increases Plasma Epicatechin Concentrations in Healthy Adults, *J. Am. Coll. Nutr.* 23 (2004) 197–204.
- [97] H. Schroeter, C. Heiss, J. Balzer, P. Kleinbongard, C.L. Keen, N.K. Hollenberg, et al., (-)-Epicatechin mediates beneficial effects of flavanol-rich cocoa on vascular function in humans., *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 103 (2006) 1024–9.
- [98] S. Baba, N. Osakabe, Y. Kato, M. Natsume, A. Yasuda, T. Kido, et al., Continuous intake of polyphenolic compounds containing cocoa powder reduces LDL oxidative susceptibility and has beneficial effects on plasma HDL-cholesterol concentrations in humans., *Am. J. Clin. Nutr.* 85 (2007) 709–17.
- [99] S. Baba, M. Natsume, A. Yasuda, Y. Nakamura, T. Tamura, N. Osakabe, et al., Plasma LDL and HDL cholesterol and oxidized LDL concentrations are altered in normo- and hypercholesterolemic humans after intake of different levels of cocoa powder., *J. Nutr.* 137 (2007) 1436–41.
- [100] D. Grassi, C. Lippi, S. Necozione, G. Desideri, C. Ferri, Short-term administration of dark chocolate is followed by a significant increase in insulin sensitivity and a decrease in blood pressure in healthy persons., *Am. J. Clin. Nutr.* 81 (2005) 611–4.
- [101] D. Grassi, S. Necozione, C. Lippi, G. Croce, L. Valeri, P. Pasqualetti, et al., Cocoa reduces blood pressure and insulin resistance and improves endothelium-dependent vasodilation in hypertensives., *Hypertension.* 46 (2005) 398–405.
- [102] L. Letenneur, C. Proust-Lima, a. Le Gouge, J.F. Dartigues, P. Barberger-Gateau, Flavonoid intake and cognitive decline over a 10-year period, *Am. J. Epidemiol.* 165 (2007) 1364–1371.
- [103] E.E. Devore, J.H. Kang, M.M.B. Breteler, F. Grodstein, Dietary intakes of berries and flavonoids in relation to cognitive decline, *Ann. Neurol.* 72 (2012) 135–143.
- [104] P. Mecocci, M.C. Polidori, Antioxidant clinical trials in mild cognitive impairment and Alzheimer's disease, *Biochim. Biophys. Acta - Mol. Basis Dis.* 1822 (2012) 631–638.
- [105] T. Persson, B.O. Popescu, A. Cedazo-Minguez, Oxidative stress in Alzheimer's disease: why did antioxidant therapy fail?, *Oxid. Med. Cell. Longev.* (2014) 427318.

- [106] D. Medellín, L. Raz, Revisión taxonómica y análisis de distribución del género *Garcinia* L. (Clusiaceae) en Colombia., Salvador Bahía, Brasil, (2014). <http://www.botanica.org.br/trabalhos-cientificos/65CNBot/3995-DIC.pdf>.
- [107] B.. Rivero, J.A., Brunner, *Garcinia madruno*, in: Árboles Frutales Exóticos Y Poco Conoc. En Puerto Rico, (2006): pp. 71–80.
- [108] T.K. Lim, Edible Medicinal And Non-Medicinal Plants, *Edible Med. Non-Medicinal Plants*. 2 (2012) 867–878.
- [109] G.C. Cury, C. Abela, J. a Bravo, J.M. Peñarrieta, W.J. Rendón, Estudio Del Fruto Comestible De La Especie Vegetal *Garcinia Madruno*, *Rev. Boliv. Química*. 29 (2012) 87–93.
- [110] E. Osorio D, G. Montoya P, J. Bastida, Caracterización fitoquímica de una fracción de biflavonoides de *Garcinia madruno*: Su inhibición de la oxidación de LDL humana y su mecanismo de estabilización de especies radicalarias, *Vitae*. 16 (2009) 369–377.
- [111] N. Jamila, M. Khairuddean, S.N. Khan, N. Khan, Complete NMR assignments of bioactive rotameric (3-8) biflavonoids from the bark of *Garcinia hombroniana*, *Magn. Reson. Chem*. 52 (2014) 345–352.
- [112] S. Kumar, S. Sharma, S.K. Chattopadhyay, The potential health benefit of polyisoprenylated benzophenones from *Garcinia* and related genera: ethnobotanical and therapeutic importance., *Fitoterapia*. 89 (2013) 86–125.
- [113] V. Babu, S.M. Ali, S. Sultana, M. Ilyas, A biflavonoid from *Garcinia nervosa*, *Phytochemistry*. 27 (1988) 3332–3335.
- [114] U.M. Acuña, K. Dastmalchi, M.J. Basile, E.J. Kennelly, Quantitative high-performance liquid chromatography photo-diode array (HPLC-PDA) analysis of benzophenones and biflavonoids in eight *Garcinia* species, *J. Food Compos. Anal*. 25 (2012) 215–220.
- [115] M. Hemshekhar, K. Sunitha, M.S. Santhosh, S. Devaraja, K. Kemparaju, B.S. Vishwanath, et al., An overview on genus *Garcinia*: Phytochemical and therapeutical aspects, *Phytochem. Rev*. 10 (2011) 325–351.
- [116] J. Wittenauer, S. Falk, U. Schweiggert-Weisz, R. Carle, Characterisation and quantification of xanthonenes from the aril and pericarp of mangosteens (*Garcinia mangostana* L.) and a mangosteen containing functional beverage by HPLC-DAD-MS n, *Food Chem*. 134 (2012) 445–452.
- [117] B.S. Jena, G.K. Jayaprakasha, R.P. Singh, K.K. Sakariah, Chemistry and Biochemistry of (–)-Hydroxycitric Acid from *Garcinia*, *J. Agric. Food Chem*. 50 (2002) 10–22.
- [118] R.B. Semwal, D.K. Semwal, I. Vermaak, A. Viljoen, A comprehensive scientific overview of *Garcinia cambogia*., *Fitoterapia*. 102 (2015) 134–148.
- [119] Y.S. Lewis, S. Neelakantan, (–)-Hydroxycitric acid—the principal acid in the fruits of *Garcinia cambogia* desr., *Phytochemistry*. 4 (1965) 619–625.
- [120] O.R. Ayepola, M.E. Cerf, N.L. Brooks, O.O. Oguntibeju, Kolaviron, a biflavonoid complex of *Garcinia kola* seeds modulates apoptosis by suppressing oxidative stress and inflammation in diabetes-induced nephrotoxic rats., *Phytomedicine*. 21 (2014) 1785–93.
- [121] V.S. Gontijo, W.A.S. Judice, B. Codonho, I.O. Pereira, D.M. Assis, J.P. Januário, et al., Leishmanicidal, antiproteolytic and antioxidant evaluation of natural biflavonoids isolated from *Garcinia brasiliensis* and their semisynthetic derivatives., *Eur. J. Med. Chem*. 58 (2012) 613–23.
- [122] V.S. Gontijo, T.C. de Souza, I.A. Rosa, M.G. Soares, M.A. da Silva, W. Vilegas, et al., Isolation and evaluation of the antioxidant activity of phenolic constituents of the *Garcinia brasiliensis* epicarp, *Food Chem*. 132 (2012) 1230–1235.
- [123] S. Fatmawati, T. Ersam, K. Shimizu, The inhibitory activity of aldose reductase in vitro by constituents of *Garcinia mangostana* Linn., *Phytomedicine*. 22 (2015) 49–51.
- [124] S.O. Abarikwu, Kolaviron, a natural flavonoid from the seeds of *Garcinia kola*, reduces LPS-induced inflammation in macrophages by combined inhibition of IL-6 secretion, and

- inflammatory transcription factors, ERK1/2, NF- κ B, p38, Akt, p-c-JUN and JNK., *Biochim. Biophys. Acta.* 1840 (2014) 2373–81.
- [125] J. Pedraza-Chaverri, N. Cárdenas-Rodríguez, M. Orozco-Ibarra, J.M. Pérez-Rojas, Medicinal properties of mangosteen (*Garcinia mangostana*)., *Food Chem. Toxicol.* 46 (2008) 3227–39.
- [126] E.O. Farombi, S. Shrotriya, Y.-J. Surh, Kolaviron inhibits dimethyl nitrosamine-induced liver injury by suppressing COX-2 and iNOS expression via NF- κ B and AP-1., *Life Sci.* 84 (2009) 149–55.
- [127] E.O. Farombi, B.F. Adepoju, O.E. Ola-Davies, G.O. Emerole, Chemoprevention of aflatoxin B1-induced genotoxicity and hepatic oxidative damage in rats by kolaviron, a natural bioflavonoid of *Garcinia kola* seeds., *Eur. J. Cancer Prev.* 14 (2005) 207–14.
- [128] E.O. Farombi, P. Møller, L.O. Dragsted, Ex-vivo and in vitro protective effects of kolaviron against oxygen-derived radical-induced DNA damage and oxidative stress in human lymphocytes and rat liver cells., *Cell Biol. Toxicol.* 20 (2004) 71–82.
- [129] E.O. Farombi, O.O. Akanni, G.O. Emerole, Antioxidant and Scavenging Activities of Flavonoid Extract (Kolaviron) of *Garcinia kola* Seeds, *Pharm. Biol.* 40 (2002) 107–116.
- [130] E.O. Farombi, J.G. Tahnteng, A.O. Agboola, J.O. Nwankwo, G.O. Emerole, Chemoprevention of 2-acetylaminofluorene-induced hepatotoxicity and lipid peroxidation in rats by kolaviron--a *Garcinia kola* seed extract., *Food Chem. Toxicol.* 38 (2000) 535–41.
- [131] E.O. Farombi, I.A. Nwaokeafor, Anti-oxidant mechanisms of kolaviron: studies on serum lipoprotein oxidation, metal chelation and oxidative membrane damage in rats., *Clin. Exp. Pharmacol. Physiol.* 32 (2005) 667–74.
- [132] Y. Yonei, Y. Takahashi, S. Hibino, M. Watanabe, T. Yoshioka, Effects on the Human Body of a Dietary Supplement Containing L-Carnitine and *Garcinia cambogia* Extract: A Study using Double-blind Tests., *J. Clin. Biochem. Nutr.* 42 (2008) 89–103.
- [133] K. Hayamizu, Y. Ishii, I. Kaneko, M. Shen, Y. Okuhara, N. Shigematsu, et al., Effects of *garcinia cambogia* (Hydroxycitric Acid) on visceral fat accumulation: a double-blind, randomized, placebo-controlled trial., *Curr. Ther. Res. Clin. Exp.* 64 (2003) 551–67.
- [134] C. Lu, T. Yang, C. Wu, J. Doong, P. Lin, C. Chiang, et al., Clinical Evaluation of and Extract of *Garcinia cambogia* for Obese Adults in Taiwan, *Nutr Sci J.* 37 (2012) 75–84.
- [135] H.G. Preuss, D. Bagchi, M. Bagchi, C.V.S. Rao, D.K. Dey, S. Satyanarayana, Effects of a natural extract of (-)-hydroxycitric acid (HCA-SX) and a combination of HCA-SX plus niacin-bound chromium and *Gymnema sylvestre* extract on weight loss., *Diabetes. Obes. Metab.* 6 (2004) 171–80.
- [136] R.O. Ferreira, M.G. De Carvalho, T.M.S. Da Silva, Ocorrência de biflavonoides em clusiaceae: aspectos químicos e farmacológicos, *Quim. Nova.* 35 (2012) 2271–2277.
- [137] H.P. Kim, H. Park, K.H. Son, H.W. Chang, S.S. Kang, Biochemical pharmacology of biflavonoids: implications for anti-inflammatory action., *Arch. Pharm. Res.* 31 (2008) 265–73.
- [138] T. Ito, R. Yokota, T. Watarai, K. Mori, M. Oyama, H. Nagasawa, et al., Isolation of Six Isoprenylated Biflavonoids from the Leaves of *Garcinia subelliptica*, *Chem. Pharm. Bull.* 61 (2013) 551–558.
- [139] U.M. Acuña, M. Figueroa, A. Kavalier, N. Jancovski, M.J. Basile, E.J. Kennelly, Benzophenones and biflavonoids from *Rheedia edulis*, *J. Nat. Prod.* 73 (2010) 1775–1779.
- [140] H. Yang, M. Figueroa, S. To, S. Baggett, B. Jiang, M.J. Basile, et al., Benzophenones and biflavonoids from *garcinia livingstonei* fruits, *J. Agric. Food Chem.* 58 (2010) 4749–4755.
- [141] M.F. Otuki, C. a. Bernardi, A.S. Prudente, K. Laskoski, F. Gomig, C.D.S. Horinouchi, et al., *Garcinia gardneriana* (Planchon & Triana) Zappi. (Clusiaceae) as a topical anti-

- inflammatory alternative for cutaneous inflammation, *Basic Clin. Pharmacol. Toxicol.* 109 (2011) 56–62.
- [142] K.-A. Tuansulong, N. Hutadilok-Towatana, W. Mahabusarakam, D. Pinkaew, K. Fujise, Morelloflavone from *Garcinia dulcis* as a novel biflavonoid inhibitor of HMG-CoA reductase., *Phytother. Res.* 25 (2011) 424–8.
- [143] D. Pinkaew, N. Hutadilok-Towatana, B.-B. Teng, W. Mahabusarakam, K. Fujise, Morelloflavone, a biflavonoid inhibitor of migration-related kinases, ameliorates atherosclerosis in mice, *AJP Hear. Circ. Physiol.* 302 (2012) H451–H458.
- [144] M.Y. Heng, S.N. Tan, J.W.H. Yong, E.S. Ong, Emerging green technologies for the chemical standardization of botanicals and herbal preparations, *TrAC - Trends Anal. Chem.* 50 (2013) 1–10.
- [145] D. Pei, J. Xu, Q. Zhuang, H.-F. Tse, M. a Esteban, Induced pluripotent stem cell technology in regenerative medicine and biology., *Adv. Biochem. Eng. Biotechnol.* 123 (2010) 127–141.
- [146] C. Corradini, C. Lantano, A. Cavazza, Innovative analytical tools to characterize prebiotic carbohydrates of functional food interest, *Anal. Bioanal. Chem.* 405 (2013) 4591–4605.
- [147] R. Singh, N. Kaur, L. Kishore, G.K. Gupta, Management of diabetic complications: a chemical constituents based approach., *J. Ethnopharmacol.* 150 (2013) 51–70.
- [148] D. Hygreeva, M.C. Pandey, K. Radhakrishna, Potential applications of plant based derivatives as fat replacers, antioxidants and antimicrobials in fresh and processed meat products, *Meat Sci.* 98 (2014) 47–57.
- [149] E. Bouyer, G. Mekhloufi, V. Rosilio, J.-L. Grossiord, F. Agnely, Proteins, polysaccharides, and their complexes used as stabilizers for emulsions: alternatives to synthetic surfactants in the pharmaceutical field?, *Int. J. Pharm.* 436 (2012) 359–78.
- [150] J.F. Ayala-Zavala, V. Vega-Vega, C. Rosas-Domínguez, H. Palafox-Carlos, J.A. Villa-Rodríguez, M.W. Siddiqui, et al., Agro-industrial potential of exotic fruit byproducts as a source of food additives, *Food Res. Int.* 44 (2011) 1866–1874.
- [151] R.D. Hancock, Recent patents on vitamin C: opportunities for crop improvement and single-step biological manufacture., *Recent Pat. Food. Nutr. Agric.* 1 (2009) 39–49.
- [152] Natural Source Vitamin E (Tocopherols and Tocotrienols) – A Global Market Overview, *Industry-Experts.* (2013). <http://industry-experts.com/verticals/healthcare-and-pharma/natural-source-vitamin-e-tocopherols-and-tocotrienols-a-global-market-overview> (accessed April 13, 2015).
- [153] Global Polyphenols Market By Product (Grape Seed, Green Tea and Apple), By Application (Functional Beverages, Functional Food and Dietary Supplements) Expected to Reach USD 1,025.7 Million by 2020: Grand View Research, Inc, *Gd. View Res.* (2014). <http://www.grandviewresearch.com/press-release/global-polyphenols-market> (accessed April 13, 2015).
- [154] International Trade Centre (ITC), The North American Market for Natural Products: Prospects for Andean and African Products, *Int. Trade Cent.* (2012) 1–10.
- [155] P.M. Murray, S. Moane, C. Collins, T. Beletskaya, O.P. Thomas, A.W.F. Duarte, et al., Sustainable production of biologically active molecules of marine based origin, *N. Biotechnol.* 30 (2013) 839–850.
- [156] M. D'Archivio, C. Filesì, R. Vari, B. Scazzocchio, R. Masella, Bioavailability of the polyphenols: Status and controversies, *Int. J. Mol. Sci.* 11 (2010) 1321–1342.
- [157] Food and Drug Administration, Bioavailability and Bioequivalence Studies for Orally Administered Drug Products. Guidance for Industry, *Food Drug Adm.* (2003).
- [158] M.J. Rein, M. Renouf, C. Cruz-Hernandez, L. Actis-Goretta, S.K. Thakkar, M. da Silva Pinto, Bioavailability of bioactive food compounds: A challenging journey to bioefficacy, *Br. J. Clin. Pharmacol.* 75 (2013) 588–602.

- [159] J.D. Lambert, J. Hong, G.-Y. Yang, J. Liao, C.S. Yang, Inhibition of carcinogenesis by polyphenols: evidence from laboratory investigations., *Am. J. Clin. Nutr.* 81 (2005) 284S–291S.
- [160] T. Hirvonen, J. Virtamo, P. Korhonen, D. Albanes, P. Pietinen, Flavonol and flavone intake and the risk of cancer in male smokers (Finland)., *Cancer Causes Control.* 12 (2001) 789–96.
- [161] M.G. Hertog, D. Kromhout, C. Aravanis, H. Blackburn, R. Buzina, F. Fidanza, et al., Flavonoid intake and long-term risk of coronary heart disease and cancer in the seven countries study., *Arch. Intern. Med.* 155 (1995) 381–6.
- [162] A. Rodriguez-Mateos, D. Vauzour, C.G. Krueger, D. Shanmuganayagam, J. Reed, L. Calani, et al., Bioavailability, bioactivity and impact on health of dietary flavonoids and related compounds: an update, *Arch. Toxicol.* 88 (2014) 1803–1853.
- [163] F. Saura-Calixto, J. Serrano, I. Goñi, Intake and bioaccessibility of total polyphenols in a whole diet, *Food Chem.* 101 (2007) 492–501.
- [164] U. Lewandowska, K. Szewczyk, E. Hrabec, A. Janecka, S. Gorlach, Overview of metabolism and bioavailability enhancement of polyphenols, *J. Agric. Food Chem.* 61 (2013) 12183–12199.
- [165] S.B. Lotito, W.J. Zhang, C.S. Yang, A. Crozier, B. Frei, Metabolic conversion of dietary flavonoids alters their anti-inflammatory and antioxidant properties, *Free Radic. Biol. Med.* 51 (2011) 454–463.
- [166] G. Williamson, C. Manach, Bioavailability and bioefficacy of polyphenols in humans.II.Review of 93 intervention studies, *Am J Clin Nutr.* 81 (2005) 243S–255S.
- [167] P. Bandyopadhyay, A.K. Ghosh, C. Ghosh, Recent developments on polyphenol–protein interactions: effects on tea and coffee taste, antioxidant properties and the digestive system., *Food Funct.* 3 (2012) 592–605.
- [168] D. Tagliacruzchi, E. Verzelloni, D. Bertolini, A. Conte, In vitro bio-accessibility and antioxidant activity of grape polyphenols, *Food Chem.* 120 (2010) 599–606.
- [169] J. Boyer, D. Brown, R.H. Liu, In vitro digestion and lactase treatment influence uptake of quercetin and quercetin glucoside by the Caco-2 cell monolayer., *Nutr. J.* 4 (2005) 1.
- [170] J.P. Spencer, F. Chaudry, a S. Pannala, S.K. Srai, E. Debnam, C. Rice-Evans, Decomposition of cocoa procyanidins in the gastric milieu., *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 272 (2000) 236–241.
- [171] L.Y. Rios, R.N. Bennett, S. a. Lazarus, C. Révész, A. Scalbert, G. Williamson, Cocoa procyanidins are stable during gastric transit in humans, *Am. J. Clin. Nutr.* 76 (2002) 1106–1110.
- [172] A. Karawajczyk, V. Drgan, N. Medic, G. Oboh, S. Passamonti, M. Novič, Properties of flavonoids influencing the binding to bilirubin transporter investigated by neural network modelling, *Biochem. Pharmacol.* 73 (2007) 308–320.
- [173] Y. Konishi, Z. Zhao, M. Shimizu, Phenolic acids are absorbed from the rat stomach with different absorption rates, *J. Agric. Food Chem.* 54 (2006) 7539–7543.
- [174] S. Passamonti, U. Vrhovsek, A. Vanzo, F. Mattivi, The stomach as a site for anthocyanins absorption from food, *FEBS Lett.* 544 (2003) 210–213.
- [175] J.M. Gee, M.S. DuPont, A.J. Day, G.W. Plumb, G. Williamson, I.T. Johnson, Intestinal transport of quercetin glycosides in rats involves both deglycosylation and interaction with the hexose transport pathway., *J. Nutr.* 130 (2000) 2765–71.
- [176] D. Del Rio, A. Rodriguez-Mateo, J.P.E. Spencer, M. Tognolini, G. Borges, A. Crozier, Dietary (poly)phenolics in human health: structures, bioavailability, and evidence of protective effects against chronic diseases, *Antioxid. Redox Signal.* 18 (2012) 1818–92.
- [177] A.I. Alvarez, R. Real, M. Pérez, G. Mendoza, J.G. Prieto, G. Merino, Modulation of the activity of ABC transporters (P-glycoprotein, MRP2, BCRP) by flavonoids and drug response., *J. Pharm. Sci.* 99 (2010) 598–617.

- [178] P. Hodek, P. Trefil, M. Stiborová, Flavonoids-potent and versatile biologically active compounds interacting with cytochromes P450., *Chem. Biol. Interact.* 139 (2002) 1–21.
- [179] Y. Otake, F. Hsieh, T. Walle, Glucuronidation versus oxidation of the flavonoid galangin by human liver microsomes and hepatocytes., *Drug Metab. Dispos.* 30 (2002) 576–81.
- [180] L. Calani, D. Del Rio, M. Luisa Callegari, L. Morelli, F. Brighenti, Updated bioavailability and 48 h excretion profile of flavan-3-ols from green tea in humans., *Int. J. Food Sci. Nutr.* 63 (2012) 513–21.
- [181] J.J.J. Van Der Hoof, R.C.H. De Vos, V. Mihaleva, R.J. Bino, L. Ridder, N. De Roo, et al., Structural elucidation and quantification of phenolic conjugates present in human urine after tea intake, *Anal. Chem.* 84 (2012) 7263–7271.
- [182] B. Magnusson, U. Örnemark, *The Fitness for Purpose of Analytical Methods – A Laboratory Guide to Method Validation and Related Topics* (2nd ed), (2014). <http://www.eurachem.org/images/stories/Guides/pdf/valid.pdf>.
- [183] D. Duffau, F. Rojas, I. Guerrero, L. Roa, M. Soto, M. Aguilera, et al., Guía Técnica: Validación de métodos y determinación de la incertidumbre de la medición, (2010). http://www.ispch.cl/sites/default/files/documento_tecnico/2010/12/Guia_Tecnica_1_validacion_de_Metodos_y_determinacion_de_la_incertidumbre_de_la_medicion_1.pdf.
- [184] Asociación Española de Farmacéuticos de la Industria (AEFI), *Validación de Métodos Analíticos*, (2001).
- [185] J. Ermer, P. Nethercote, *Method Validation in Pharmaceutical Analysis: A Guide to Best Practice*, Wiley-VCH, (2015).
- [186] C. Andres-Lacueva, M. Monagas, N. Khan, M. Izquierdo-Pulido, M. Urpi-Sarda, J. Permanyer, et al., Flavanol and flavonol contents of cocoa powder products: influence of the manufacturing process., *J. Agric. Food Chem.* 56 (2008) 3111–7.
- [187] M. Cádiz-Guerra, J. Lozano-Sanchez, M. Contreras-Gómez, L. Legeai-Mallet, S. Fernandez-Arrollo, A. Segura-Carretero, Isolation , comprehensive characterization and antioxidant activities of Theobroma cacao extract, *J. Funct. Foods.* 10 (2014) 485–498.
- [188] C.H. Risner, Simultaneous determination of theobromine, (+)-catechin, caffeine, and (-)-epicatechin in standard reference material baking chocolate 2384, cocoa, cocoa beans, and cocoa butter., *J. Chromatogr. Sci.* 46 (2008) 892–9.
- [189] M. Innocenti, M. Michelozzi, C. Giaccherini, F. Ieri, F.F. Vincieri, N. Mulinacci, Flavonoids and biflavonoids in tuscan berries of *Juniperus communis* L.: Detection and quantitation by HPLC/DAD/ESI/MS, *J. Agric. Food Chem.* 55 (2007) 6596–6602.
- [190] a. Romani, C. Galardi, P. Pinelli, N. Mulinacci, D. Heimler, HPLC quantification of flavonoids and biflavonoids in Cupressaceae leaves, *Chromatographia.* 56 (2002) 469–474.
- [191] R. Hayes, A. Ahmed, T. Edge, H. Zhang, Core-shell particles: Preparation, fundamentals and applications in high performance liquid chromatography., *J. Chromatogr. A.* 1357 (2014) 36–52.
- [192] B. Botta, M.M. Mac-Quhae, G.D. Monache, F.D. Monache, J.F. De Mello, Chemical Investigation of the Genus *Rheedia*, V. Biflavonoids and Xanthochymol, *J. Nat. Prod.* 47 (1984) 1053–1053.
- [193] T.A. van Beek, Chemical analysis of *Ginkgo biloba* leaves and extracts, *J. Chromatogr. A.* 967 (2002) 21–55.
- [194] M.I. Aguilar, I.A. Mejía, C. Menchaca, I. Vázquez, A. Navarrete, M.I. Chávez, et al., Determination of Biflavonoids in Four Mexican Species of *Selaginella* by HPLC, *J. AOAC Int.* 96 (2013) 712–716.
- [195] K. Hosni, K. Msaâda, M. Ben Taârit, M. Hammami, B. Marzouk, Bioactive components of three *Hypericum* species from Tunisia: A comparative study, *Ind. Crops Prod.* 31 (2010) 158–163.

- [196] R.S. Ahmad, M.S. Butt, N. Huma, M.T. Sultan, M.U. Arshad, Z. Mushtaq, et al., Quantitative and Qualitative Portrait of Green Tea Catechins (Gtc) Through Hplc, *Int. J. Food Prop.* 17 (2014) 1626–1636.
- [197] H. Jiang, U.H. Engelhardt, C. Thräne, B. Maiwald, J. Stark, Determination of flavonol glycosides in green tea, oolong tea and black tea by UHPLC compared to HPLC, *Food Chem.* 183 (2015) 30–35.
- [198] K. a Cooper, E. Campos-Giménez, D. Jiménez Alvarez, K. Nagy, J.L. Donovan, G. Williamson, Rapid reversed phase ultra-performance liquid chromatography analysis of the major cocoa polyphenols and inter-relationships of their concentrations in chocolate., *J. Agric. Food Chem.* 55 (2007) 2841–7.
- [199] Y. Sun, W. Xu, W. Zhang, Q. Hu, X. Zeng, Optimizing the extraction of phenolic antioxidants from kudingcha made from *Ilex kudingcha* C.J. Tseng by using response surface methodology, *Sep. Purif. Technol.* 78 (2011) 311–320.
- [200] S. Rodríguez-Rojo, a. Visentin, D. Maestri, M.J. Cocero, Assisted extraction of rosemary antioxidants with green solvents, *J. Food Eng.* 109 (2012) 98–103.
- [201] D. González-Gómez, V. Cardoso, D. Bohoyo, M.C. Ayuso, J. Delgado-Adamez, Application of experimental design and response surface methodology to optimize the procedure to obtain a bactericide and highly antioxidant aqueous extract from orange peels, *Food Control.* 35 (2014) 252–259.
- [202] F. Chemat, Zill-E-Huma, M.K. Khan, Applications of ultrasound in food technology: Processing, preservation and extraction, *Ultrason. Sonochem.* 18 (2011) 813–835.
- [203] Y. Tao, Z. Zhang, D.W. Sun, Kinetic modeling of ultrasound-assisted extraction of phenolic compounds from grape marc: Influence of acoustic energy density and temperature, *Ultrason. Sonochem.* 21 (2014) 1461–1469.
- [204] M. Heydari Majd, A. Rajaei, D. Salar Bashi, S.A. Mortazavi, S. Bolourian, Optimization of ultrasonic-assisted extraction of phenolic compounds from bovine pennyroyal (*Phlomischema parviflorum*) leaves using response surface methodology, *Ind. Crops Prod.* 57 (2014) 195–202.
- [205] T. Prommajak, S. Surawang, N. Rattanapanone, Ultrasonic-assisted extraction of phenolic and antioxidative compounds from lizard tail (*Houttuynia cordata* Thunb.), 36 (2014) 65–72.
- [206] R. Tabaraki, A. Nateghi, Optimization of ultrasonic-assisted extraction of natural antioxidants from rice bran using response surface methodology, *Ultrason. Sonochem.* 18 (2011) 1279–1286.
- [207] G. Zhang, L. He, M. Hu, Optimized ultrasonic-assisted extraction of flavonoids from *Prunella vulgaris* L. and evaluation of antioxidant activities in vitro, *Innov. Food Sci. Emerg. Technol.* 12 (2011) 18–25.
- [208] S. Şahin, Ö. Aybastier, E. Işık, Optimisation of ultrasonic-assisted extraction of antioxidant compounds from *Artemisia absinthium* using response surface methodology, *Food Chem.* 141 (2013) 1361–1368.
- [209] J. Lai, H. Wang, D. Wang, F. Fang, F. Wang, T. Wu, Ultrasonic Extraction of Antioxidants from Chinese Sumac (*Rhus typhina* L.) Fruit Using Response Surface Methodology and Their Characterization, *Molecules.* 19 (2014) 9019–9032.
- [210] D. Bartnik, C. Mohler, M. Houlihan, Methods for the production of food grade extracts, *United States Pat. Appl.* 20060088627. (2007).
- [211] W. Bi, M. Tian, K.H. Row, Evaluation of alcohol-based deep eutectic solvent in extraction and determination of flavonoids with response surface methodology optimization., *J. Chromatogr. A.* 1285 (2013) 22–30.
- [212] J.P. Maran, K. Swathi, P. Jeevitha, J. Jayalakshmi, G. Ashvini, Microwave-assisted extraction of pectic polysaccharide from waste mango peel, *Carbohydr. Polym.* 123 (2015) 67–71.

- [213] W. Wang, X. Ma, Y. Xu, Y. Cao, Z. Jiang, T. Ding, et al., Ultrasound-assisted heating extraction of pectin from grapefruit peel: optimization and comparison with the conventional method., *Food Chem.* 178 (2015) 106–14.
- [214] L.C. Vriesmann, R.F. Teófilo, C.L.D.O. Petkowicz, Optimization of nitric acid-mediated extraction of pectin from cacao pod husks (*Theobroma cacao* L.) using response surface methodology, *Carbohydr. Polym.* 84 (2011) 1230–1236.
- [215] R. Minjares-Fuentes, A. Femenia, M.C. Garau, J.A. Meza-Velázquez, S. Simal, C. Rosselló, Ultrasound-assisted extraction of pectins from grape pomace using citric acid: a response surface methodology approach., *Carbohydr. Polym.* 106 (2014) 179–89.
- [216] Z. Jamsazzadeh Kermani, A. Shpigelman, H.T.T. Pham, A.M. Van Loey, M.E. Hendrickx, Functional properties of citric acid extracted mango peel pectin as related to its chemical structure, *Food Hydrocoll.* 44 (2015) 424–434.
- [217] L.C. Vriesmann, R.F. Teófilo, C. Lúcia de Oliveira Petkowicz, Extraction and characterization of pectin from cacao pod husks (*Theobroma cacao* L.) with citric acid, *LWT - Food Sci. Technol.* 49 (2012) 108–116.
- [218] J.-M. Brillouet, É. Odoux, In vivo kinetics of β -glucosidase towards glucovanillin and related phenolic glucosides in heat-treated vanilla pod (*Vanilla planifolia*, Orchidaceae), *Fruits.* 65 (2010) 85–95.
- [219] C. Romero-Segura, R. García-Rodríguez, A. Sánchez-Ortiz, C. Sanz, A.G. Pérez, The role of olive β -glucosidase in shaping the phenolic profile of virgin olive oil, *Food Res. Int.* 45 (2012) 191–196.
- [220] R. Hachicha Hbaieb, F. Kotti, R. García-Rodríguez, M. Gargouri, C. Sanz, A.G. Pérez, Monitoring endogenous enzymes during olive fruit ripening and storage: correlation with virgin olive oil phenolic profiles., *Food Chem.* 174 (2015) 240–7.
- [221] N. Jiménez, L. Carrillo-Hormaza, A. Pujol, F. Álzate, E. Osorio, O. Lara-Guzman, Antioxidant capacity and phenolic content of commonly used anti-inflammatory medicinal plants in Colombia, *Ind. Crops Prod.* 70 (2015) 272–279.
- [222] H. Speisky, C. López-Alarcón, M. Gómez, J. Fuentes, C. Sandoval-Acuña, First web-based database on total phenolics and oxygen radical absorbance capacity (ORAC) of fruits produced and consumed within the south andes region of South America, *J. Agric. Food Chem.* 60 (2012) 8851–8859.
- [223] D. Haytowitz, S. Bhagwat, USDA Database for the Oxygen Radical Absorbance Capacity (ORAC) of Selected Foods, Release 2, US Dep. Agric. (2010) 10 – 48. http://www.pureacaiberry.com/testimonials/ORAC_R2.pdf.
- [224] United States Department of Agriculture (USDA), Oxygen Radical Absorbance Capacity (ORAC) of Selected Foods, Release 2, (2012). <http://www.ars.usda.gov/services/docs.htm?docid=15866> (accessed May 13, 2015).
- [225] C. Kevers, A. Sipel, J. Pincemail, J. Dommes, Antioxidant Capacity of Hydrophilic Food Matrices: Optimization and Validation of ORAC Assay, *Food Anal. Methods.* 7 (2014) 409–416.
- [226] L.C. Carrillo, J. Londoño-Londoño, A. Gil, Comparison of polyphenol, methylxanthines and antioxidant activity in *Theobroma cacao* beans from different cocoa-growing areas in Colombia, *Food Res. Int.* 60 (2014) 273–280.
- [227] M. Szeląg, D. Mikulski, M. Molski, Quantum-chemical investigation of the structure and the antioxidant properties of α -lipoic acid and its metabolites., *J. Mol. Model.* 18 (2012) 2907–16.
- [228] D. Zhang, Y. Liu, L. Chu, Y. Wei, D. Wang, S. Cai, et al., Relationship between the structures of flavonoids and oxygen radical absorbance capacity values: A quantum chemical analysis, *J. Phys. Chem. A.* 117 (2013) 1784–1794.
- [229] G. Litwinienko, K.U. Ingold, Solvent effects on the rates and mechanisms of reaction of phenols with free radicals, *Acc. Chem. Res.* 40 (2007) 222–230.

- [230] R. Prior, X. Wu, K. Schaich, Standardized methods for the determination of antioxidant capacity and phenolics in foods and dietary supplements. *Journal Agriculture Food Chemistry, Agric. Food Chem.* (2005) 4290–4302.
- [231] N. Liang, D. Kitts, Antioxidant Property of Coffee Components: Assessment of Methods that Define Mechanisms of Action, *Molecules*. 19 (2014) 19180–19208.
- [232] M. Musialik, R. Kuzmich, T.S. Pawcowski, G. Litwinienko, Acidity of Hydroxyl Grps: Overlooked Influence on Antioxidant Properties of Flavonoid, *J. Org. Chem.* 74 (2009) 2699–2709.
- [233] J.S. Wright, E.R. Johnson, G. a. DiLabio, Predicting the activity of phenolic antioxidants: Theoretical method, analysis of substituent effects, and application to major families of antioxidants, *J. Am. Chem. Soc.* 123 (2001) 1173–1183.
- [234] K. Lemańska, H. Szymusiak, B. Tyrakowska, R. Zieliński, A.E.M.F. Soffers, I.M.C.M. Rietjens, The influence of pH on antioxidant properties and the mechanism of antioxidant action of hydroxyflavones, *Free Radic. Biol. Med.* 31 (2001) 869–881.
- [235] O. Firuzi, A. Lacanna, R. Petrucci, G. Marrosu, L. Saso, Evaluation of the antioxidant activity of flavonoids by “ferric reducing antioxidant power” assay and cyclic voltammetry, *Biochim. Biophys. Acta - Gen. Subj.* 1721 (2005) 174–184.
- [236] O.B. Huang D Prior R L, The chemistry behind antioxidant capacity assays., *J. Agric. Food Chem.* 53 (2005) 1841–1856.
- [237] K.L. Wolfe, R.H. Liu, Structure-activity relationships of flavonoids in the cellular antioxidant activity assay, *J. Agric. Food Chem.* 56 (2008) 8404–8411.
- [238] J. Gabrielsson, D. Weiner, Non-compartmental analysis., *Methods Mol. Biol.* 929 (2012) 377–89.
- [239] O. González, M.E. Blanco, G. Iriarte, L. Bartolomé, M.I. Maguregui, R.M. Alonso, Bioanalytical chromatographic method validation according to current regulations, with a special focus on the non-well defined parameters limit of quantification, robustness and matrix effect, *J. Chromatogr. A.* 1353 (2014) 10–27.
- [240] European Medicines Agency (EMA), Guideline on bioanalytical method validation, 44 (2012) 1–23.
- [241] Food and Drug Administration, Guidance for Industry Bioanalytical Method Validation, (2013).
- [242] S. Liao, Q. Ren, C. Yang, T. Zhang, J. Li, X. Wang, et al., Liquid Chromatography–Tandem Mass Spectrometry Determination and Pharmacokinetic Analysis of Amentoflavone and Its Conjugated Metabolites in Rats, *J. Agric. Food Chem.* 63 (2015) 1957–1966.
- [243] A.-C. Liu, L.-X. Zhao, S.-W. Yu, H.-X. Lou, Pre-treatment with puerarin affects pharmacokinetics of warfarin, but not clopidogrel, in experimental rats, *Chin. J. Nat. Med.* 13 (2015) 257–263.
- [244] L.P. Li, X.D. Wu, Z.J. Chen, S.Y. Sun, J.F. Ye, S. Zeng, et al., Interspecies difference of luteolin and apigenin after oral administration of *Chrysanthemum morifolium* extract and prediction of human pharmacokinetics, *Pharmazie*. 68 (2013) 195–200.
- [245] D. Sun, L. Dong, P. Guo, W. Yan, C. Wang, Z. Zhang, Simultaneous determination of four flavonoids and one phenolic acid in rat plasma by LC-MS/MS and its application to a pharmacokinetic study after oral administration of the *Herba Desmodii Styrcifolii* extract, *J. Chromatogr. B Anal. Technol. Biomed. Life Sci.* 932 (2013) 66–73.
- [246] S. Zheng, Z. Ma, H. Han, J. Ye, R. Wang, S. Cai, et al., Post-column mobile phase adjustment: A strategy to eliminate the contradiction between liquid chromatography and mass spectrometry in the determination of flavonoids in rat plasma, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 95 (2014) 176–183.
- [247] M. Colovic, C. Fracasso, S. Caccia, Brain-to-plasma distribution ratio of the biflavone amentoflavone in the mouse., *Drug Metab. Lett.* 2 (2008) 90–4.

- [248] M. Colovic, S. Caccia, Liquid chromatography-tandem mass spectrometry of 13,118-biapigenin, the major biflavone in *Hypericum perforatum* extracts, *J. Chromatogr. B Anal. Technol. Biomed. Life Sci.* 863 (2008) 74–79.
- [249] S. Ahmad, H. Kalra, A. Gupta, B. Raut, A. Hussain, M.A. Rahman, HybridSPE: A novel technique to reduce phospholipid-based matrix effect in LC-ESI-MS Bioanalysis., *J. Pharm. Bioallied Sci.* 4 (2012) 267–75.
- [250] X. Guo, E. Lankmayr, Phospholipid-based matrix effects in LC-MS bioanalysis., *Bioanalysis.* 3 (2011) 349–52.
- [251] X. Wang, X. Zhao, L. Gu, C. Lv, B. He, Z. Liu, et al., Simultaneous determination of five free and total flavonoids in rat plasma by ultra HPLC-MS/MS and its application to a comparative pharmacokinetic study in normal and hyperlipidemic rats, *J. Chromatogr. B Anal. Technol. Biomed. Life Sci.* 953-954 (2014) 1–10.
- [252] S. Saha, W. Hollands, P.W. Needs, L.M. Ostertag, B. de Roos, G.G. Duthie, et al., Human O-sulfated metabolites of (-)-epicatechin and methyl(-)-epicatechin are poor substrates for commercial aryl-sulfatases: implications for studies concerned with quantifying epicatechin bioavailability., *Pharmacol. Res.* 65 (2012) 592–602.
- [253] A. Crozier, M.N. Clifford, H. Ashihara, *Plant Secondary Metabolites*, Blackwell Publishing Ltd, Oxford, UK, 2006.
- [254] A. Crozier, D. Del Rio, M.N. Clifford, Bioavailability of dietary flavonoids and phenolic compounds, *Mol. Aspects Med.* 31 (2010) 446–467.
- [255] H. Michler, G. Laakmann, H. Wagner, Development of an LC-MS method for simultaneous quantitation of amentoflavone and biapigenin, the minor and major biflavones from *Hypericum perforatum* L., in human plasma and its application to real blood., *Phytochem. Anal.* 22 (2011) 42–50.
- [256] L. Actis-Goretta, A. Lévêques, M. Rein, A. Teml, C. Schäfer, U. Hofmann, et al., Intestinal absorption, metabolism, and excretion of (-)-epicatechin in healthy humans assessed by using an intestinal perfusion technique, *Am. J. Clin. Nutr.* 98 (2013) 924–933.
- [257] Z. Chen, S. Kong, F. Song, L. Li, H. Jiang, Pharmacokinetic study of luteolin, apigenin, chrysoeriol and diosmetin after oral administration of *Flos Chrysanthemi* extract in rats, *Fitoterapia.* 83 (2012) 1616–1622.
- [258] Z. Chen, M. Chen, H. Pan, S. Sun, L. Li, S. Zeng, et al., Role of catechol-O-methyltransferase in the disposition of luteolin in rats., *Drug Metab. Dispos.* 39 (2011) 667–74.
- [259] R. Rodrigo, D. Gil-Becerra, Implications of Polyphenols on Endogenous Antioxidant Defense Systems in Human Diseases, in: *Polyphenols Hum. Heal. Dis.*, Elsevier, (2014): pp. 201–217.
- [260] M.-C. Chang, H.-H. Chang, T.-M. Wang, C.-P. Chan, B.-R. Lin, S.-Y. Yeung, et al., Antiplatelet Effect of Catechol Is Related to Inhibition of Cyclooxygenase, Reactive Oxygen Species, ERK/p38 Signaling and Thromboxane A2 Production, *PLoS One.* 9 (2014) e104310.
- [261] E. Scoditti, N. Calabriso, M. Massaro, M. Pellegrino, C. Storelli, G. Martines, et al., Mediterranean diet polyphenols reduce inflammatory angiogenesis through MMP-9 and COX-2 inhibition in human vascular endothelial cells: a potentially protective mechanism in atherosclerotic vascular disease and cancer., *Arch. Biochem. Biophys.* 527 (2012) 81–9.
- [262] N.R. Perron, J.L. Brumaghim, A review of the antioxidant mechanisms of polyphenol compounds related to iron binding, *Cell Biochem. Biophys.* 53 (2009) 75–100.
- [263] J. Kim, K.W. Lee, H.J. Lee, Polyphenols suppress and modulate inflammation: Possible roles in health and disease, in: *Polyphenols Hum. Heal. Dis.*, Elsevier Inc., (2014): pp. 393–408.

- [264] S. Manzano, G. Williamson, Polyphenols and phenolic acids from strawberry and apple decrease glucose uptake and transport by human intestinal Caco-2 cells., *Mol. Nutr. Food Res.* 54 (2010) 1773–1780.
- [265] O. Kwon, P. Eck, S. Chen, C.P. Corpe, J.-H. Lee, M. Kruhlak, et al., Inhibition of the intestinal glucose transporter GLUT2 by flavonoids., *FASEB J.* 21 (2007) 366–377.
- [266] A. Barrett, T. Ndou, C. a. Hughey, C. Straut, A. Howell, Z. Dai, et al., Inhibition of α -amylase and glucoamylase by tannins extracted from cocoa, pomegranates, cranberries, and grapes, *J. Agric. Food Chem.* 61 (2013) 1477–1486.
- [267] M.H. Johnson, A. Lucius, T. Meyer, E. Gonzalez De Mejia, Cultivar evaluation and effect of fermentation on antioxidant capacity and in vitro inhibition of α -amylase and α -glucosidase by highbush blueberry (*vaccinium corombosum*), *J. Agric. Food Chem.* 59 (2011) 8923–8930.
- [268] D. Grussu, D. Stewart, G.J. McDougall, Berry polyphenols inhibit α -amylase in vitro: Identifying active components in rowanberry and raspberry, *J. Agric. Food Chem.* 59 (2011) 2324–2331.
- [269] M.K. Unnikrishnan, V. Veerapur, Y. Nayak, P.P. Mudgal, G. Mathew, Antidiabetic, Antihyperlipidemic and Antioxidant Effects of the Flavonoids, in: *Polyphenols Hum. Heal. Dis.*, (2014): pp. 143–161.
- [270] N. Khan, H. Mukhtar, Tea polyphenols for health promotion, *Life Sci.* 81 (2007) 519–533.
- [271] S. Sae-Tan, K. a. Grove, J.D. Lambert, Weight control and prevention of metabolic syndrome by green tea, *Pharmacol. Res.* 64 (2011) 146–154.
- [272] D. Vauzour, J. Kerr, C. Czank, Plant Polyphenols as Dietary Modulators of Brain Functions, in: *Polyphenols Hum. Heal. Dis.*, Elsevier, (2014): pp. 357–370.