



Universidad Austral de Chile
Facultad de Ciencias
Escuela de Química y Farmacia

PROFESOR PATROCINANTE: Dra. Susan Hess F.
INSTITUTO DE QUÍMICA
FACULTAD DE CIENCIAS

PROFESOR PATROCINANTE: Prof. Magdalena Romero A.
INSTITUTO DE BOTÁNICA
FACULTAD DE CIENCIAS

**“DETERMINACIÓN DE PIGMENTOS FOLIARES MEDIANTE TÉCNICA HPLC EN
Laurelia sempervirens TRATADA CON SUPLEMENTO DE RADIACIÓN UV-B Y SU
EFECTO EN EL CRECIMIENTO”**

**Tesis de Grado presentada como
parte de los requisitos para optar
al Título de Químico Farmacéutico**

MARISOL SOLEDAD CARVAJAL NAVARRO
VALDIVIA-CHILE
2005

*A mi papá, hermanita y a una Gran persona que Dios puso en mi camino, Mi Querida
Madrina y en forma muy especial a mi mamita que me impulsó a lograr esta meta*

*“Todo lo puedo en Cristo
que me fortalece”
Filipenses 4-13*

AGRADECIMIENTOS

En primer lugar agradezco a mis dos profesoras patrocinantes, Profesora Magdalena Romero del Instituto de Botánica, quien me acogió con mucho entusiasmo y amabilidad en su Instituto, brindándome siempre un gran apoyo y tiempo para resolver mis inquietudes. Dra .Susan Hess, del Instituto de Química, gracias por el apoyo, consejos y dedicación para el logro de esta tesis.

Agradezco de igual manera a la profesora Carin Akesson, del Instituto de Farmacia, quien siempre con una gran disponibilidad me facilitó los medios y demostró preocupación hacia este trabajo.

También merecen mi agradecimiento, Profesor Juan Carlos Paredes del Instituto de Química, Joel Pardo del Instituto de Farmacia, Griselda Iturra, del Instituto de Botánica, quien me facilitó el laboratorio y materiales para el desarrollo de la presente Tesis. Gracias a todos por su tiempo y conocimientos entregados.

A Rodrigo, gracias por su ayuda constante, paciencia y por haber compartido sus conocimientos para el buen logro de esta tesis.

Finalmente agradezco de corazón a lo más importante, a Dios por la vida y por darme en ella la oportunidad de forjarme como profesional, a mi familia que día a día fueron alentándome con amor y creyeron en mí , al Hogar Luterano por el gran apoyo brindado, a mi Madrina Gisela, que desde lejos siempre me brindó su hermosa amistad y me dio los medios para llegar hasta aquí. Para finalizar agradezco enormemente a mi mamita preciosa, que me dio fuerzas y depositó en mí este sueño.

ÍNDICE DE CONTENIDOS

	Pág.
Dedicatoria	
Agradecimientos	I
Índice de contenidos	II
Índice de figuras	IV
Índice de tablas	VII
Lista de abreviaturas	VIII
1. RESUMEN	1
SUMMARY	2
2. .INTRODUCCIÓN	3
2.1. Radiación solar	3
2.2. Radiación ultravioleta B	4
2.3. Efectos de la radiación UV-B en las plantas	5
2.4. Flavonoides; caracterización química	7
2.4.1. Propiedades terapéuticas de flavonoides	14
2.4. <i>B</i> -caroteno y clorofila	16
2.5. Hipótesis	21
2.6. Objetivo general	21
2.7. Objetivos específicos	21

3. MATERIALES Y MÉTODOS	22
3.1. Material vegetal y características generales	22
3.2. Lugar de trabajo	23
3.3. Tratamiento aplicado	24
3.4. Metodología	24
3.4.1. Determinación de parámetros de crecimiento	24
3.4.2. Determinación del contenido hídrico	25
3.4.3. Determinación de la estructura foliar	25
3.4.4. Determinación del contenido de cenizas de las plantas	26
3.4.5. Determinación del pH y conductividad del suelo de las plantas	26
3.5. Reactivos empleados en análisis de pigmentos foliares	27
3.6. Determinación de pigmentos foliares	28
3.6.1. Extracción de pigmentos foliares	28
3.6.2. Partición con éter de petróleo y metanol	29
3.6.3. Hidrólisis de flavonoides	29
3.6.4. Determinación de pigmentos fotosintéticos	30
3.6.5. Aplicación de cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) en la determinación de pigmentos foliares	34
3.6.6. Identificación, calibración y cuantificación de <i>B</i> -caroteno	38
3.6.7. Identificación, calibración y cuantificación de flavonoides	40
3.7. Análisis estadístico	40
4. RESULTADOS	41
4.1. Condiciones ambientales	41

4.2. Parámetros de crecimiento en plántulas de <i>Laurelia sempervirens</i>	42
4.2.1.Crecimiento del tallo	42
4.2.2.Número de hojas	43
4.2.3.Número de brotes	43
4.2.4.Biomasa	45
4.2.5.Redistribución de biomasa	46
4.2.6.Contenido de cenizas de las plantas	47
4.2.7.Conductividad y pH del suelo	47
4.2.8.Estructura foliar	49
4.3. Análisis de pigmentos foliares en <i>Laurelia sempervirens</i>	51
4.3.1. Extracción y partición de pigmentos foliares	51
4.3.2. Hidrólisis	53
4.3.3. Determinación de clorofila según Lichtenthaler y Willburn (1983)	54
4.3.4. Identificación del <i>B</i> -caroteno por HPLC	54
4.3.5. Identificación de flavonoides	59
5. DISCUSION	65
6. CONCLUSIÓN	77
7. GLOSARIO	79
8. BIBLIOGRAFÍA	80

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1.	Núcleo básico de los flavonoides	9
Figura 2.	Estructuras básica de los principales grupos de flavonoides	11
Figura 3	Biosíntesis de flavonoides	12
Figura 4	Estructura de flavonoides Myricetina, Apigenina, Quercetina, Kamferol y Luteolina)	13
Figura 5	Fórmulas estructurales de pigmentos fotosintéticos	19
Figura 6	Esquema extracción, partición e hidrólisis de pigmentos foliares de <i>Laurelia sempervirens</i>	31
Figura 7	Cámara de tratamiento en condiciones ambientales de plantas de Laurel sometidas al tratamiento de radiación UV-B ambiental y plántulas control bajo radiación solar ambiental	32
Figura 8	Espectro de absorción de carotenos y clorofilas solubles en éter de petróleo (A); Espectro de absorción de flavonoides en extracto metanólico (B) y Espectro de absorción de estándares puros de flavonoides en metanol 100% (C)	33
Figura 9	Equipo HPLC Jasco LC-2000 Plus Chrompass EZ Chromelite de fase reversa.	39
Figura 10	Efecto de radiación UV-B ambiental y suplemento de radiación UV-B en crecimiento de tallo (A), N° de hojas (B) y N° de brotes (C).	44
Figura 11	Efecto del suplemento de radiación UV-B en el Peso seco (%PF) y contenido hídrico (%PF)	45

Figura 12	Redistribución de asimilados en plántulas de <i>L.sempervirens</i> bajo radiación solar (A) y bajo suplemento de irradiación UV-B (B)	46
Figura 13	Absorbancia máxima de flavonoides, carotenos y clorofilas totales en <i>L. Sempervirens</i>	52
Figura 14	Espectro de absorción de flavonoides totales no hidrolizados (-) Y flavonoides hidrolizados (..) en extracto foliar de <i>L. sempervirens</i> .	53
Figura 15	Cromatograma del estándar de <i>B</i> -caroteno, resuelto en HPLC fase reversa	55
Figura 16	Cromatograma del <i>B</i> -caroteno resuelto en HPLC fase Reversa.	56
Figura 17	Curva de calibración del estándar puro de <i>B</i> -caroteno, corrido en HPLC fase reversa	58
Figura 18	Cromatograma del estándar de Kamferol resuelto en HPLC de fase reversa	60
Figura 19	Cromatograma de flavonoides en extracto metanólico de <i>L.sempervirens</i> , resuelto por HPLC fase reversa	61
Figura 20	Curvas de calibración de estándares puros de Myricetina, Quercetina y Kamferol corridos en HPLC fase reversa	63
Figura 21	Concentraciónl (mg/L) de flavonoides en extracto de 0,8 gr. de hojas de <i>L. sempervirens</i> , determinado en HPLC	64

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1.	Promedios mensuales de temperatura, precipitación, flujo de Fotonos fotosintéticos (PPF) 400-700 nm, y de radiación ultravioleta B biológicamente efectiva (UV-B _{BE}) 280-320 nm	41
Tabla 2.	Efecto del suplemento de radiación UV-B en el contenido de cenizas (% PS) de los diferentes órganos	47
Tabla 3.	Conductividad y pH del suelo bajo el suplemento de radiación UV-B ambiental (+UV-B) y exentas de suplemento (control)	48
Tabla 4.	Parámetros morfométrico medidos al M.O en corte transversal en hojas de plantas de <i>L. sempervirens</i>	50
Tabla 5.	Concentración de clorofilas (µg/mL) en extracto foliar de <i>L. sempervirens</i>	54
Tabla 6.	Tiempos de retención (min.) de <i>B</i> -caroteno	57
Tabla 7.	Concentración de <i>B</i> -caroteno (ppm) en hojas de <i>L. sempervirens</i> control y tratadas	59
Tabla 8.	Tiempos de retención (min.) de los flavonoides identificados en las muestras en estudio	62

LISTA DE ABREVIATURAS

ACN	Acetonitrilo
Cl	Clorofila
DE	Desviación estándar
E.P	Éter de petróleo
HPLC	“High Performance Liquid Chromatography”, Cromatografía Líquida de Alta Resolución
min	Minuto
mL	Mililitro
m.s.m	Metros sobre el nivel del mar
M.O	Microscopio óptico
nm	Nanómetro
P.A	Previo análisis
ppb	Partes por billón
ppm	Partes por millón
PPF	Flujo de fotones fotosintéticos (400-700) nm
u.a.	Unidad de absorbancia
UV	Radiación ultravioleta
UV-B _{BE}	Radiación ultravioleta B biológicamente efectiva (280-320) nm
+UV-B	Suplemento de radiación UV-B

1. RESUMEN

Se estudió bajo condiciones de campo en el Jardín Botánico, Campus Isla Teja, de la Universidad Austral de Chile, Valdivia, el efecto de radiación ultravioleta-B suplementaria sobre el contenido de pigmentos foliares y crecimiento de *Laurelia sempervirens* mediante estudios espectrofotométricos y cromatográficos.

L. sempervirens corresponde a una especie arbórea nativa que crece entre Colchagua y Puerto Montt, importante por su amplio uso en la medicina popular. El suplemento de radiación UV-B consistió en la aplicación de una dosis de radiación solar UV-B de $38,4 \mu\text{W}/\text{cm}^2$, por 5 horas diarias durante 6 meses (Septiembre de 2003-Febrero de 2004) la que fue aportada por 4 lámparas Philips Q panel, UV 313 (Hanna Instruments Neurtek).

Plantas crecidas en exceso de UV-B presentaron una disminución significativa en altura, caída de hojas, aumento de brotes axilares, engrosamiento de lámina foliar respecto a plantas control. Estos cambios morfológicos ocurrieron sin una reducción en el total de producción de materia seca. La radiación UV-B indujo un aumento en la síntesis de pigmentos fotosintéticos y filtradores de radiación UV-B, como los flavonoides Quercetina y Kamferol, lo que se asoció con la sobrevivencia de la especie.

Por primera vez se estaría reportando en *L. sempervirens* la identificación de compuestos antioxidantes y el incremento en su contenido por efecto del UV-B, lo que sugiere que nuestra flora contiene una cantidad de componentes, que en gran parte no se han identificado.

SUMMARY

Spectroscopic and chromatographic studies of the growing and the foliar pigments production of *Laurelia sempervirens* as response to enhanced ultraviolet radiation were made. Plants grower up under field conditions in the Botanic Garden of the Universidad Austral de Chile, Campus Isla Teja, Valdivia.

Laurelia sempervirens is a native tree specie that grown between Colchagua and Puerto Montt and is important by its use in popular medicine. Supplemental ultraviolet-B (UV-B) radiation of $38,4 \mu\text{W}/\text{cm}^2$ was provided by four Q-panel lamps (Q-313, Hanna Instruments Neurtek) for five hours daily, during six months (from September 2003 to February 2004).

Plants grown in excess of UV-B radiation presented a significant decrement in high and in fall of leaves, however axial buds and foliar sheet increased, been these morphological changes independent of the dry matter total production. Chemical studies suggested that UV-B radiation produces an increment of chlorophyll concentration and some flavonoids as Kampherol and Quercetin as well, this last is associated with plants adaptation mechanisms to UV-B radiation.

On this work, for first time synthesis of antioxidant compounds on *L. sempervirens*, as response to UV-B radiation, has been reported, suggesting that native plants present still several unidentified compounds.

2. INTRODUCCIÓN

2.1 Radiación solar

La energía que se traslada a través de ondas electromagnéticas se denomina radiación. El contenido energético de la radiación depende de su longitud de onda. El sol, con una temperatura superficial de alrededor de 6000 °K, emite la mayor parte de su energía a través de ondas electromagnéticas. La radiación con longitudes de onda entre 280-380nm se denomina radiación ultravioleta (UV). Ésta incluye la radiación UV-A (320-380 nm), UV-B (280-320 nm) y UV-C con longitud de onda menor a 280nm (STEUBING et al., 2001). La energía es inversamente proporcional a la longitud de onda, de esta forma la radiación UV-C, de menor longitud de onda, es la radiación mayormente energética lo que es incompatible con todas las formas de vida y es bloqueada por completo en la capa de ozono. Por el contrario, la radiación UV-A, de mayor longitud de onda, es relativamente inofensiva y pasa casi en su totalidad a través de la capa de ozono; entre ambas, la UV-B (280-320 nm) es menos letal que la UV-C pero peligrosa y altamente energética, lo que puede acarrear daños a la salud y al medio ambiente. Esta es absorbida en su mayor parte por la capa de ozono estratosférica (Björn., 1999).

El espectro de radiación solar sensible al ojo humano se denomina luminosidad o luz blanca y corresponde a longitudes de onda entre los 380-780 nm. La radiación infrarroja (750-4000 nm) afecta el balance térmico y los procesos morfogénicos de las plantas. Al final de la escala del espectro electromagnético se encuentra la radiación de

onda larga (4000 a 100.000 nm), emitida por la superficie de la tierra y sus organismos (STEUBING et al., 2001).

La radiación UV puede ser dañina para los seres vivos, sobre todo cuando su longitud de onda es baja. En los seres humanos, la exposición a radiación ultravioleta de longitudes de onda inferiores a los 320 nm puede producir quemaduras, mientras una exposición prolongada durante varios años y debido a su efecto acumulativo puede hacer más severas las quemaduras del sol y avejentar la piel, llegando a provocar cáncer de piel, daño a los ojos (incluyendo cataratas) y daño al sistema inmunológico, exponiendo a la persona a la acción de bacterias y virus. Sin embargo, la radiación ultravioleta-B no sólo tiene efectos perniciosos; gran parte de la vitamina D que las personas y los animales necesitan para mantenerse sanos se produce cuando la piel es irradiada por rayos ultravioleta. Por otro lado la radiación UV-A en los seres humanos es responsable del bronceado inmediato y fotoenvejecimiento de piel. También la radiación UV-A artificial suele emplearse como fototerapia en algunos procesos dermatológicos, como la psoriasis (CARREÑO et al., 2002).

2.2 Radiación ultravioleta B

La radiación ultravioleta-B (UV-B) que comprende la banda de longitud de onda desde los 280nm a los 320nm, penetra desde el sol a la superficie de la tierra en una manera fuertemente dependiente del contenido de ozono de la atmósfera. No obstante la cantidad de radiación UV-B que alcanza la superficie terrestre es de sólo un 0,3% de la radiación UV-B emitida por el sol (BJÖRN, 1999). Estudios realizados en los últimos años muestran que existe una disminución primaveral de ozono en la estratosfera

antártica, lo cual tiene como efecto la disminución de ozono global, particularmente en latitudes geográficas mayores como en el Sur de Chile. De acuerdo a LOVENGREEN, (2000) los promedios mensuales de ozono total obtenidos desde el espacio con el TOMS ¹ para la Región de Valdivia desde 1978 al 2000, muestran una tendencia decreciente de un 5,6% por década.

2.3 Efectos de la radiación UV-B en las plantas

Las plantas, definidas como fotoautótrofas, obtienen su energía a partir de la radiación solar por medio del proceso de la fotosíntesis, de modo que, están fuertemente influenciadas por la naturaleza e intensidad de la energía radiante durante toda su vida. Son, por lo tanto, especialmente vulnerables a los cambios en los niveles de radiación UV-B ambiental cuya proporción con el flujo de radiación fotosintética (PPF) y la radiación UV-A esta establecida como PPF:UV-A:UV-B=100:10:1 (STEUBING et al., 2001).

Los vegetales expuestos a concentraciones mayores de radiación ultravioleta se ven afectados en numerosos procesos, entre los que se incluyen cambios estructurales, fisiológicos y bioquímicos. Como cambios estructurales tenemos, volumen de células y forma de la hoja, lo que puede alterar el régimen de radiación interna. El incremento del grosor foliar y de epidermis adaxial en especies crecidas bajo niveles aumentados de radiación UV-B afecta la tasa y trayectoria de fotones atenuando el efecto de esta radiación (ROZEMA et al, 1999). Sin embargo plantas crecidas bajo un suplemento de

¹ TOMS: Total Ozone Spectrometer, sistema con el que la NASA ha equipado desde 1978 diversos satélites y que proporciona un mapa global diario del contenido total de ozono.

radiación UV-B también muestran incremento en la epidermis abaxial (OLSSON et al., 1999). El tejido esponjoso con grandes cantidades de espacios de aire entre las células, y con su forma irregular, tienden a difundir mejor la radiación (BORNMAN, 1999). Alteraciones morfológicas causadas por UV-B, tales como incrementos en número de hojas y ramas, reducción de longitud de tallo y tamaño de las hojas puede ser regulado indirectamente vía flavonoides y auxinas (JANSEN et al., 1998).

Dentro de los cambios fisiológicos a causa de incrementos en radiación UV-B se ha visto en general una reducción de la fotosíntesis, disminución del crecimiento, variación en el contenido de pigmentos fotosintéticos. y declinación en la producción de algunas especies de cultivo (ROZEMA et al, 1999). Los cambios bioquímicos en las plantas pueden expresarse como incremento en la síntesis de pigmentos absorbedores, alteración en las concentraciones de hormonas de crecimiento y daño al ADN el que resulta potencialmente peligroso para la célula, ya que un único fotón afectando una única molécula de ADN puede dar lugar a efectos dramáticos y en ocasiones letales. Entre los pigmentos absorbedores están algunos compuestos fenólicos como los flavonoides. Estos se acumulan en la epidermis y en la ceras epicuticulares de las hojas evitando que la radiación alcance las células donde se realiza la fotosíntesis (DAY et al., 1992; KARABOURNIOTIS et al., 1999). Por lo que las ceras epicuticulares y la epidermis son los primeros filtros a la radiación. Algunos de los flavonoides presentes en plantas pueden actuar como verdaderos antioxidantes atrapando especies activas del oxígeno como singlete de oxígeno, superóxido y radicales peróxido. Flavonoides tales como Kamferol y Quercetina actúan previniendo el fotoblanqueamiento de carotenoides e inhibiendo el transporte polar de la auxina, hormona vegetal que regula

los procesos del crecimiento de la planta (BRUNN et al., 1992). Además, se les atribuye funciones de defensa contra la predación de los insectos y de resistencia frente a parásitos. Algunos flavonoides presentes en plantas causan la activación de genes bacterianos implicados en la formación de nódulos radicales (*Rhizobium*) y capaces de captar directamente el nitrógeno atmosférico (VILLAR, 1999).

El incremento en la concentración de flavonoides como respuesta de las plantas al suplemento de radiación UV-B ambiental ha sido observado por diversos autores (BALLARÉ et al., 1995; BORNMAN, 1999), detectándose que esta radiación estimula la síntesis de aquellos flavonoides que poseen mayor cantidad de grupos hidroxilos sugiriendo por tanto, un incremento en el potencial antioxidante (HUSAIN et al., 1987).

2.4 Flavonoides; caracterización química

Las plantas superiores sintetizan una amplia variedad de compuestos fenólicos durante su crecimiento y desarrollo, entre ellos los flavonoides. Químicamente se caracterizan por ser una de las clases más largas de compuestos fenólicos (TAIZ et al., 2002).

La palabra flavonoide viene del latín “flavus” que significa amarillo. Constituyen la mayoría de los pigmentos amarillos (flavonas, flavonoles, chalconas, auronas), rojos y azules (antocianos) de flores y algunos frutos. Se les encuentra en todos los órganos de las plantas, especialmente en los aéreos como hojas y botones florales, y más frecuentemente en las plantas superiores (MONTES, 1992). Los flavonoides se encuentran además en frutas, verduras, semillas, vino, té negro y soja, los cuales son

consumidos en la dieta humana en forma habitual. También pueden incorporarse en forma de suplementos nutricionales, junto con ciertas vitaminas y minerales (MARTÍNEZ et al., 2002).

Se presentan como flavonoides libres de azúcares (geninas) o mayormente como flavonoides unidos a azúcares formando los heterósidos (MONTES et al., 1992). La ventaja de esta glicosilación de los flavonoides es la mejorada solubilidad en agua y la mayor estabilidad química de los glucósidos. Los azúcares que más frecuentemente se unen a las geninas son D-glucosa, D-galactosa, L-ramnosa, L-arabonosa, D-xilosa y D-glucurónido, como O-heterósido o C-heterósidos. Desde el punto de vista químico, los flavonoides son compuestos de bajo peso molecular que comparten un esqueleto básico de 15 carbonos (C6-C3-C6), unidos la mayoría, a una cadena de azúcar, están constituidos por dos anillos de fenilo (A y B) ligados a través de un anillo (C) de pirano (Fig 1.) (MARTÍNEZ et al., 2002).

Basados principalmente en el grado de oxidación del puente de tres carbonos, los flavonoides son clasificados en diferentes grupos. El esqueleto de carbono básico de un flavonoide puede tener numerosos sustituyentes (Fig. 1). Los grupos hidroxilos están usualmente presentes en la posición 4', 5' y 7, pero también pueden ser encontrados en otras posiciones. Los que tienen un grupo orto-dihidroxilo en el anillo B del esqueleto de flavonoides tienen una actividad antioxidante potencialmente aumentada comparada con aquellos que no lo tienen (OLSSON., 1998).

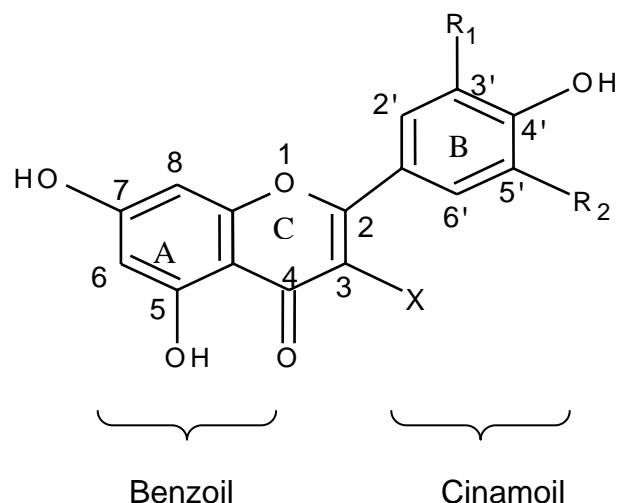


Fig.1 Núcleo básico de los flavonoides: 2-fenilbenzopirona. Se presentan los sistemas benzoil y cinamoil asociados a la absorción de dichos pigmentos. El anillo B o sistema cinamoil está asociado con la absorción de la Banda I, mientras que la Banda II está asociado al anillo A o sistema benzoil (HERTOG et al., 1992).

Dentro de la clasificación de los flavonoides tenemos diversos grupos: Chalconas, Flavonoles, Flavonas, Dihidroflavonoles (Flavanonas y Flavononoles), Antocianidinas, entre otros (Fig. 2). La síntesis de Flavonas y Flavonoles se caracterizan por ser UV-B dependiente (TAIZ, 2002). Su función es proteger las células de la excesiva radiación UV-B a través de la absorción de longitud de onda corta del espectro solar (HESS et al., 2002; TAIZ., 2002).

Los orígenes de los precursores de los flavonoides y las interrelaciones biosintéticas de los mismos se muestran en la figura 3. Los esqueletos carbonados de todos los flavonoides derivan de dos compuestos básicos procedentes del metabolismo de los hidratos de carbono: malonil CoA y un éster del CoA con un ácido hidroxicinámico (generalmente, 4-cumaroil CoA). Su formación tiene lugar por

condensación de tres moléculas de malonil CoA con el 4-cumaroil CoA, catalizado por una chalcona sintetasa. El compuesto resultante (4,2',4',6'-tetrahidroxichalcona) constituye el intermediario común a todos los flavonoides. La acción estereoespecífica de una chalcona isomerasa da lugar al primer flavonoide, una (2S)-flavanona. El mecanismo que conduce a la transformación de las flavanonas en flavonas e isoflavonas no está claramente establecido (VILLAR, 1999; TAIZ,2002).

Los dihidroflavonoles son originados por hidroxilación directa de flavanonas en posición 3 en presencia de la dioxigenasa, flavanona 3-hidroxilasa. Estos dihidroflavonoles son intermediarios biosintéticos en la formación de flavonoles y antocianidinas (VILLAR, 1999).

Las primeras investigaciones farmacológicas sobre los flavonoides se realizaron en 1913, pero no fue hasta 1936 cuando Rusznyák y Szent-Györgi pusieron de manifiesto la capacidad protectora vascular de la "citrina", complejo de naturaleza flavonoide aislado a partir del limón (VILLAR, 1999). Se han descubierto más de 600 flavonoides. Todos ellos parecen tener un papel muy importante en la alimentación humana, dado que presentan propiedades medicinales muy interesantes (MARTÍNEZ, 2002).

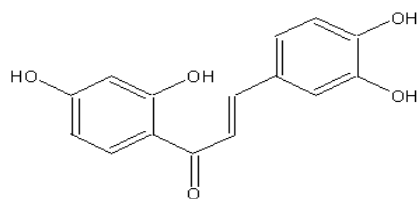
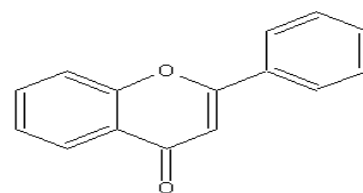
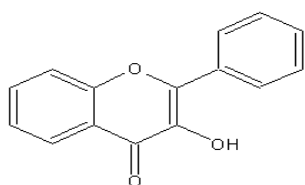
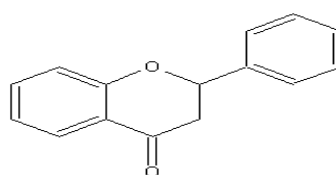
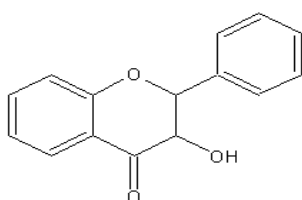
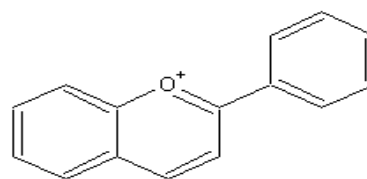
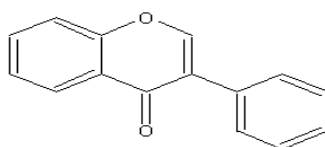
ChalconaFlavonaFlavonolFlavanonaFlavanonolAntocianidinaIsoflavonoide

Fig. 2 Estructuras básica de los principales grupos de flavonoides. Chalconas, Flavonoles, Flavonas, Dihidroflavonoles (Flavanonas e Flavanonoles), Antocianidinas e Isoflavonoides.

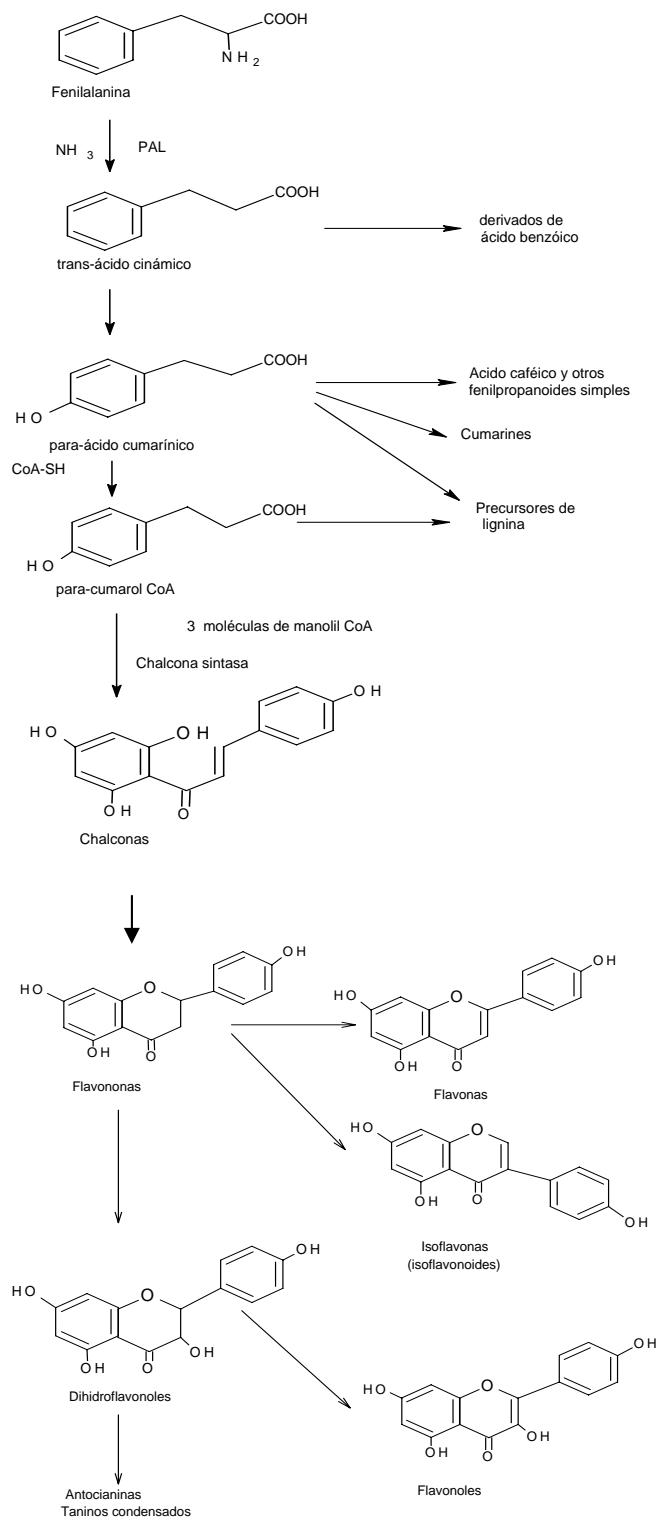


Fig.3 Biosíntesis de flavonoides. PAL (fenilalanina amonio liasa), CHS (chalcona sintetasa), CHI (chalcona isomerasa).

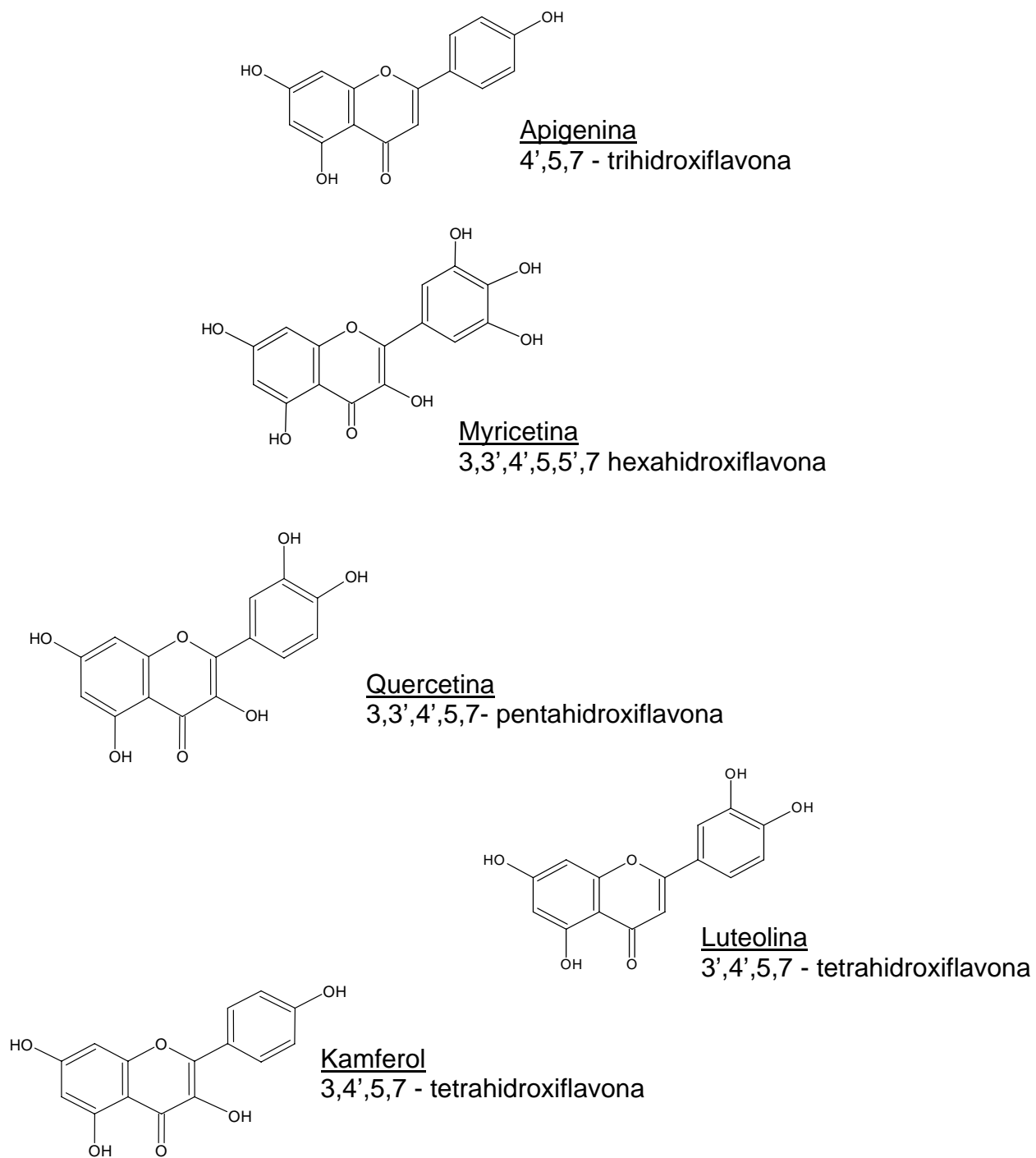


Fig.4 Estructura de los flavonoides Apigenina, Myricetina, Quercetina, Luteolina y Kamferol.

2.4.1 Propiedades terapéuticas de flavonoides

Las propiedades antioxidantes de los flavonoides se deben a la capacidad de su estructura química de transferir electrones, y en segundo lugar, a su habilidad para quelar metales. Esta capacidad de quelar metales especialmente cobre y hierro, los hace actuar indirectamente como antioxidantes ya que inhiben la acción de los metales como catalizadores en la formación de radicales libres (CADENAS, 1999).

Estas moléculas se caracterizan por ser esencialmente medicamentos para la insuficiencia venosa situándose su acción a nivel de las pequeñas venas o de los capilares donde disminuye la permeabilidad y aumenta la resistencia de los capilares (acción vitamínica P) (MONTES, 1992; GARCÍA et al., 2002).

Además algunos flavonoides tienen un efecto tónico sobre el corazón, potenciando el músculo cardíaco y mejorando la circulación rol atribuido fundamentalmente al flavonoide Quercetina aunque aparece en menor intensidad en otros como Genisteína y Luteolina (MARTÍNEZ, 2002). En ratas se ha podido comprobar que Quercetina mejora la función contráctil del ventrículo izquierdo y reduce la incidencia de trastornos de la conducción cardíaca mejorando la circulación y previniendo la formación de trombos intravasculares (HERTOG et al., 1992; MARTÍNEZ et al., 2002).

También se han mostrado tremendamente eficaces en el tratamiento del cáncer. Se sabe que pueden inhibir el crecimiento de células cancerosas (MARTÍNEZ, 2002), demostrando acción antiproliferativa y anticarcinogénica, así como el papel de agente

quimiopreventivo (HERTOG et al., 1992; CADENAS, 1999; MARTÍNEZ et al., 2002). Experimentos *in vitro* han confirmado que algunos como Quercetina, poseen actividad antiproliferativa específica en células de la leucemia humana promielocítica, acción que se realiza a través de una unión tipo II con los sitios estrogénicos o mediante la estimulación del factor de crecimiento b1. Esta acción es comparable, o aún superior, a la terapia convencional como la Doxorubicina y el Metotrexato. Quercetina exhibió efectos sinérgicos antiproliferativos con agentes terapéuticos como Cisplatino y Adriamicina, además indujo apoptosis en células tumorales (probablemente mediante un mecanismo de señal de radicales libres) (CADENAS, 1999).

Se ha comprobado su potente capacidad de inhibir la oxidación de lipoproteínas de baja densidad (LDL) y reducir la citotoxicidad de las LDL oxidadas. Altas concentraciones de flavonoides como Myricetina, pueden modificar la LDL a través de procesos que envuelven la modificación covalente de la proteína apo B 100 (RANKIN et al., 1993). Quercetina y Rutina también suprimen la oxidación de LDL. De hecho, las poblaciones que consumen productos ricos en estos flavonoides, por ser los antioxidantes dietarios mayoritarios, estadísticamente presentan menores riesgos de afecciones cardiovasculares (HERTOG et al., 1992; MARTÍNEZ et al., 2002).

Otras muchas propiedades son atribuidas a los flavonoides tales como: antialérgica, antiulcérica, antiinflamatoria, antiagregante plaquetaria (sobre todo antocianósidos y derivados de flavonas y flavonoles), diurética, etc. (VILLAR, 1999).

2.5 *B*-caroteno y clorofila

La fotosíntesis se lleva a cabo gracias a la presencia en hojas y tallos de pigmentos capaces de captar energía luminosa. Estos son los carotenos y clorofilas. Los carotenoides son terpenoides constituídos por unidades de isopreno (C_5H_8), sus esqueletos carbonados C_{40} se forman por adiciones sucesivas de unidades C_5 hasta formar el pirofosfato de geranilgeranilo, un intermediario C_{20} , que luego se condensa con otra molécula igual formando el producto de condensación C_{40} , llamado fiteno, el cual se deshidrogena para dar licopeno. Por ciclación de los extremos, el licopeno se convierte en *B*-caroteno (Fig.5) (STRYER, 2002).

En las plantas y algas los carotenoides se encuentran en los tilacoides de los cloroplastos. La regulación de la carotenogénesis está estrechamente unida al metabolismo de la clorofila, a la reorganización de las estructuras de membrana y a la estimulación lumínica. Los carotenoides son pigmentos accesorios en la fotosíntesis, captando energía luminosa en regiones del espectro donde la clorofila no absorbe eficientemente, además protegen de la luz intensa que puede dañar la clorofila e inactiva las especies reactivas de oxígeno o directamente el estado triplete de la clorofila (STRYER, 2002). El aumento de la radiación UV-B estimula en algunas especies de plantas, hongos y bacterias un incremento en el contenido de carotenoides, los que pueden cumplir importantes funciones como disipar energía como calor, filtrar fotones de longitud de onda corta, evitar el fotoblanqueamiento de la clorofila y actuar como antioxidante, inactivando posibles radicales libre generados por no filtración UV-B (GOTZ et al., 1999).

Los mamíferos no pueden sintetizar los carotenoides “de novo”, por lo que la concentración y variedad de estos pigmentos en su sangre y tejidos dependen de la ingestión. En los humanos bien nutridos los carotenoides están principalmente en el tejido adiposo, hígado, y músculo (VARGAS et al., 2003).

El *B*-caroteno, es un precursor de vitamina A, lo que potencia la respuesta inmune, previene el cáncer (de pulmón, estómago y mama) y los infartos (bloqueando la oxidación del colesterol que tampona las arterias). En general es un antioxidante biológico que reduce el daño del núcleo celular inducido por diversos radicales libres. También protege a las células de la peroxidación de los lípidos insaturados, evitando daño funcional significativo a membranas, enzimas y ácidos nucleicos (KARNAUKHOV,1990).

Ratones rapados expuestos a luz UV, inyectados con células tumorales y tratados con *B*-caroteno, desarrollaron un carcinoma muy reducido y más lentamente (EPTEIN, 1977). Se cree que los carotenoides actúan como una pantalla protectora de los deletéreo efectos de la luz visible y UV, bloqueando el desarrollo de eventos neoplásicos en la fase promocional (BENDICH, 1989). KARNAUKHOV (1990) informa que los carotenos y en especial los *B*-carotenos son capaces de inhibir la fotocarcinogénesis por radiación UV en animales, mediante un mecanismo de atrapamiento de oxígeno que disminuye la oxidación y ruptura de las cadenas de queratina del estrato córneo de la piel e impide que dicha radiación penetre a capas más profundas y afecte las células.

La clorofila es un pigmento de color verde que absorbe fotones de longitud de onda fotosintéticamente activa (400-700 nm) en las membranas tilacoideas de las hojas. Presentan estructuras policíclicas planas, formada por 4 anillos pirrólicos unidos por medio de puentes de metilo ($--CH=$) lo que constituye una porfirina. La posición central está ocupada por Mg^{2+} , el anillo IV esta esterificado con un alcohol (fitol) cadena de 20 átomos de carbono con un doble enlace ($C_{20}H_{39}OH$) (Fig.5). En general los cloroplastos contienen tanto clorofila *a* como clorofila *b*. Aunque las dos son verdes, sus espectros de absorción son suficientemente diferentes como para permitir que los dos pigmentos complementen sus gamas de absorción de la luz en la región visible. La mayoría de las plantas contienen el doble de clorofila *a* que de clorofila *b* (STRYER, 2002; HERNANDEZ, 2001). Desde el punto de vista químico el radical fitol es el responsable de la naturaleza cerosa de la clorofila y explicaría la insolubilidad del pigmento en agua y su buena solubilidad en solventes orgánicos. Este fitol no proporciona la base estructural para una integración de las moléculas de clorofila en la matriz lipoproteica de la membrana tilacoidea (HERNANDEZ, 2001).

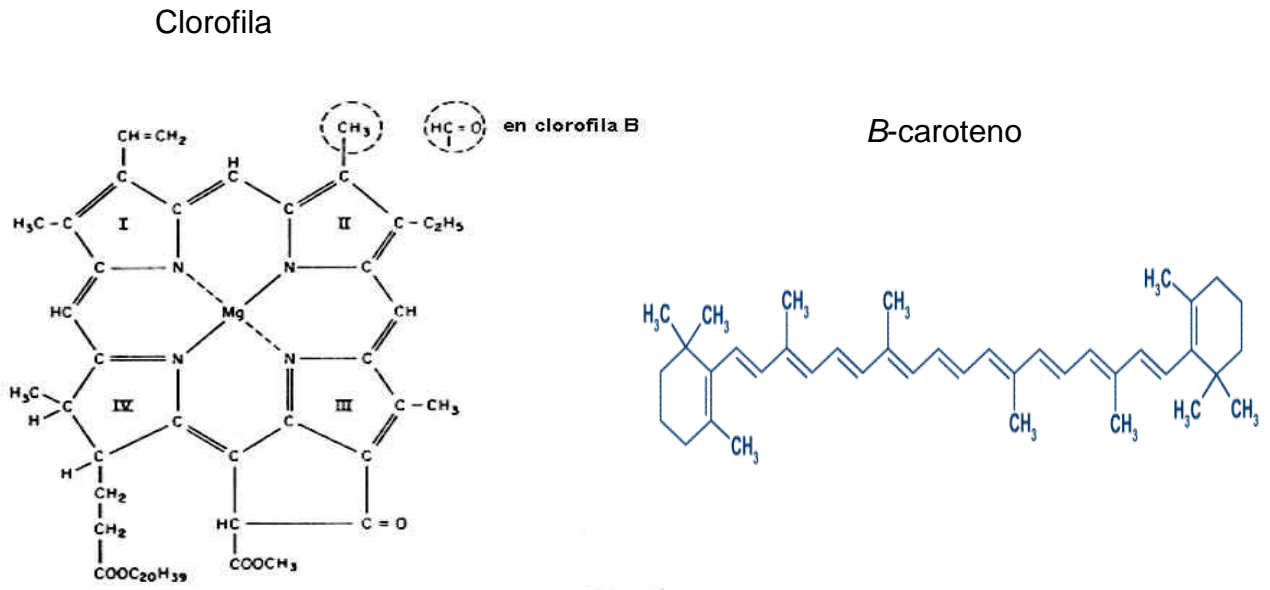


Fig.5 Fórmulas estructurales de pigmentos fotosintéticos

Dentro de las acciones y usos terapéuticos de la clorofila se conoce que aporta energía vital, proveniente de la fotosíntesis, desintoxica y oxigena las células. Por su gran actividad desodorizante, se utiliza para combatir problemas de mal aliento ocasionados por tabaco, bebidas alcohólicas, alimentos y para eliminar los olores provocados por la transpiración. La clorofila ha sido reconocida desde la antigüedad como un gran cicatrizante debido a la capacidad de estimular el crecimiento del tejido conectivo y la proliferación epidérmica. Durante la primera guerra mundial fue utilizada en los vendajes para estimular la cicatrización y retirar el tejido necrosado de las heridas (ARNAUD, 2003). QUEVEDO et al., (2001) estudiaron el efecto de una crema epitelizante de clorofila, aplicada sobre heridas abiertas experimentales en ratones, este estudio dio como resultado una epitelización altamente significativa al compararlo con los ratones del grupo control. ARNAUD, (2003) informa la acción protectora de la

clorofila frente a ciertos genotóxicos como diesel, humo del tabaco y polvo del alquitrán. El modo de acción se debería a que retira de manera muy eficiente estos componentes o se acoplaría con ellos, desactivándolos. HIGASHI-OKAI, (1998), ha investigado la acción antitumoral de productos de clorofila en modelos de animales analizando *in vivo* los efectos de clorofila *a* y *b* del té verde (*Camelia sinensis*) sobre la etapa promotora del tumor, en piel de ratón, encontrando una significativa disminución en la formación de tumor. Además la aplicación de clorofila mostró una inhibición significativa de los efectos inflamatorios inducidos por el promotor de tumor como formación de edema. Estos resultados sugirieron que la clorofila posee una importante actividad inhibitoria en la formación de tumor sobre la piel de ratón.

En los últimos años y a consecuencia de la disminución del espesor de la capa de ozono de la estratósfera, el nivel de radiación UV-B ha aumentado en la superficie terrestre trayendo consigo efectos deletéreos tanto en plantas como en seres humanos. Estudios realizados en vegetales menos sensibles han mostrado una gran variedad de mecanismos de aclimatación al aumento de radiación UV-B. En Chile existen reducidos número de trabajos relacionados con esta problemática y especialmente son de índole agrícola (PINTO et al., 2000; BRAVO et al., 2001). En árboles nativos utilizados en medicina popular no existen estudios acerca del efecto de la radiación UV-B. De ahí, que en este trabajo se plantea la siguiente interrogante; el incremento de radiación UV-B ambiental ¿afecta la síntesis de pigmentos foliares de importancia farmacológica en plantas de *L. sempervirens*?

2.6 HIPÓTESIS

Plantas de Laurel sometidas a una carga extra de radiación UV-B ambiental incrementan el contenido de pigmentos foliares filtradores y fotosintetizadores lo que se asocia con un mayor crecimiento y productividad de la planta.

2.7 OBJETIVO GENERAL

Evaluar el efecto del suplemento de radiación UV-B ambiental en el tipo y concentración de pigmentos foliares de *L. sempervirens* y su relación con el crecimiento de la planta.

2.8 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

-Determinar en plántulas de *L. sempervirens* tratadas con un suplemento de radiación UV-B ambiental la relación entre los contenidos de pigmentos foliares, el crecimiento y la productividad en biomasa evaluando: largo de tallo, número de hojas y de brotes, peso fresco y seco respecto a plántulas control.

-Desarrollar un método para la separación del *B*-caroteno con técnica HPLC de fase reversa.

-Determinar el efecto del suplemento de radiación UV-B ambiental en la concentración y tipo de pigmentos fotosintéticos y filtradores, de importancia farmacológica, mediante técnicas espectroscópicas UV-Visible y técnicas cromatográficas HPLC.

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1 Material vegetal y características generales

Se trabajó bajo condiciones de campo con plántulas de *Laurelia sempervirens* (R.et Pav.) Tul. “Laurel” (Familia Monimiácea), de 6 meses de edad que provenían de invernadero y mantenidas en bolsas de polietileno (1kg) con tierra de hojas previamente desinfectada. “Laurel” corresponde a una especie arbórea nativa que crece entre Colchagua y Puerto Montt bajo los 700 m snm. Se caracteriza por ser un árbol siempre verde, de crecimiento rápido pudiendo alcanzar 40m de altura y unos 2m de diámetro. Su corteza es de gran grosor, tiene perfume agradable y se desprende en placas circulares. Sus hojas son aromáticas, simples, glabras y miden 5 a 6 cm de largo por 2,5 a 3 de ancho (HOFFMANN, 1997).

Estudios químicos realizados con este árbol han demostrado que es una rica fuente de alcaloides complejos del tipo aporfínico y bisbencilisoquinolínico. Farmacológicamente los alcaloides de éste tipo afectan la respuesta inmune, actúan como antiinflamatorios y son de amplio uso en la medicina tradicional China para el tratamiento de la silicosis (MUÑOZ et al .,2000). De la madera de *L. sempervirens* se han aislado los alcaloides: liriodenina, oxonantenina, michelalbina, stepharina, norantenina, anonaína, isotetrandrina (MONTES,1992). Uno de los alcaloides aislados desde su madera anaranjada es un poderoso agente antimicrobiano de amplio espectro, activo frente a la presencia de bacterias y hongos, lo cual explicaría la resistencia de la madera al ataque de los microorganismos (MONTENEGRO, 2000).

Además en las hojas se ha detectado la presencia de esencias cuyos componentes mayoritarios son safrol y laurotetanina (MUÑOZ et al .,2000).

En nuestro país se utilizan las hojas, flores y corteza contra numerosos males. El uso habitual es el infuso de hojas recomendado como digestivo y como diurético (MUÑOZ et al., 2000), además se le atribuyen propiedades analgésicas para aliviar el dolor de cabeza. Por otra parte la infusión utilizada en baños de inmersión, se usa para aliviar dolores reumáticos, recomendándose también para tratar atonías del tubo digestivo y en afecciones a las vías urinarias. Las pomadas preparadas con polvo de hoja, se aplican en afecciones herpéticas (MONTENEGRO, 2000).

3.2 Lugar de trabajo

Se trabajó *in situ*, con 32 plántulas de “Laurel”, en el Jardín Botánico, Campus Isla Teja, de la Universidad Austral de Chile, Valdivia (39° 48, S,73°14W), desde Agosto de 2003 a Marzo de 2004. El clima de la región es caracterizado como mediterráneo húmedo con tendencia oceánica (Di Castri and Hajek 1976). Debido a que las plantas se ubicaron en el exterior bajo condiciones ambientales de campo se controlaron algunas variables climáticas como: precipitación, temperatura máxima y mínima además del flujo de fotones fotosintéticos (PPF) y de la radiación ultravioleta B biológicamente efectiva (UV-B_{BE}) para lo cual se utilizó información proporcionada por la Estación Meteorológica Isla Teja y por el radiómetro del Instituto de Física de la Universidad Austral de Chile.

3.3 Tratamiento aplicado

Del total de plántulas, 16 crecieron y se desarrollaron bajo la radiación solar ambiental (control) y las 16 restantes formaron parte del tratamiento ultravioleta B. Este consistió en la aplicación de una dosis de radiación solar UV-B suplementaria de 38,4 $\mu\text{W}/\text{cm}^2/\text{d}$, por 5 horas diarias durante 6 meses (Septiembre de 2003- Febrero de 2004) la que fue aportada por 4 lámparas Philips Q panel, UV 313 (Hanna Instruments Neurtek). Las lámparas fueron suspendidas a 50 cm sobre las plantas (Fig. 7). Para efecto de este trabajo la plantas tratadas bajo suplemento UV-B se designaran como +UV-B.

3.4. Metodología

3.4.1. Determinación de parámetros de crecimiento

Mensualmente se midieron (usando un método no destructivo), parámetros de crecimiento de las plantas tratadas con suplemento UV-B y de las plantas control tales como: altura del tallo (cm), número de hojas, para lo cual se consideraron sólo las hojas mayores a 1 cm y número de brotes. Al realizar la cosecha de las plántulas después de 6 meses de tratamiento UV-B se registró la altura total (tallos más raíz) y peso fresco de tallo, hojas y raíces. Del peso fresco de hojas se retiraron 0,8 gramos de material control y del tratado (n=4) y se almacenaron a -40°C para los posteriores análisis químicos. El resto de material se secó a 70°C (en estufa) hasta peso constante (peso seco). El peso seco de las hojas separadas y refrigeradas para análisis químico se

obtuvo matemáticamente y fue considerado en los resultados finales de biomasa y contenido hídrico.

3.4.2 Determinación del contenido hídrico total

El contenido hídrico total de las plantas se determinó estableciendo la diferencia entre el peso fresco (PF) y el peso seco (PS) de ellas, siguiendo las indicaciones de Steubing et al.,(2002). La diferencia entre los pesos proporcionó el contenido de agua de los tejidos, el que fue expresado en porcentaje y calculado de la siguiente forma:

$$\text{Contenido hídrico} = \frac{\text{PF} - \text{PS}}{\text{PF}} \times 100$$

3.4.3 Determinación de la estructura foliar

Debido a que la radiación UV-B puede provocar modificaciones estructurales en las hojas, se analizó la anatomía foliar al término del tratamiento, realizando cortes transversales a mano alzada de hojas frescas en plantas control y tratadas con +UV-B para montar preparaciones las que se observaron en microscopio fotónico (Carl Zeiss). Se midió el grosor de: cutícula superior e inferior, epidermis superior e inferior, parénquima en empalizada y parénquima esponjoso. El número de estomas por mm² de superficie se evaluó en trozos de epidermis aislada. El desprendimiento de la epidermis se efectuó sumergiendo trozos de hojas en alcohol de 90° por 24 horas y posteriormente 15 minutos en NaOH (0,4 gramos más 40mL de agua caliente). Luego

de lavar con agua destilada por 3 veces (Aiken & Lefkovitch, 1984), se separó la epidermis utilizando aguja enmangada. Los parámetros medidos se contabilizaron en el material de tres hojas tratadas y tres controles realizando un total de veinticinco mediciones en las respectivas hojas.

3.4.4 Determinación del contenido de cenizas de las plantas

Al finalizar el tratamiento se evaluó el contenido de cenizas de las plantas control y tratadas, calcinando en mufla a 500 °C por 5 horas 0,3 gramos de peso seco de hoja, tallo y raíz separadamente. Se consideraron tres repeticiones tomadas al azar por cada órgano.

3.4.5 Determinación del pH y conductividad del suelo de las plantas

Después de la cosecha se retiró suelo a 10 cm de profundidad de las macetas que contenían las plantas control y +UV-B para medir el pH y la conductividad eléctrica (STEUBING et al., 2001). La determinación de pH del suelo se realizó mezclando 10g de suelo seco y tamizado con 25 ml de agua destilada. Paralelamente, en otro vaso de precipitado se colocó igual cantidad de suelo con 25 ml de KCl (0,1 N). Después de agitar la suspensión durante 10 minutos, en un agitador magnético (AROS 160) se midió el pH en el sobrenadante . Para la determinación de la conductividad eléctrica de la solución de suelo se depositaron 10 g de suelo seco y tamizado en un matraz Erlenmeyer con 100 mL de agua destilada y se agitó durante 30 minutos. La

conductividad de la suspensión acuosa se midió en un conductímetro, previamente calibrado (Konduktometer CG 852). Tanto la medición del pH como de la conductividad eléctrica se realizó por triplicado.

3.5 Reactivos empleados en análisis de pigmentos foliares

Para extracción y partición de pigmentos:

solventes calidad P.A de la firma Merck: metanol , éter de petróleo

Para análisis de pigmentos por HPLC:

Acetonitrilo (Merck)

Agua *

Metanol grado HPLC

Buffer Tris HCL 0,1 M pH 8,0

Acetato de etilo grado HPLC

Estándares:

-Apigenina (SIGMA)

-Kamferol (SIGMA)

-Luteolina (SIGMA)

-Myricetina (SIGMA)

-Quercetina (SIGMA)

*El agua usada en HPLC, fue agua bidestilada y desionizada, no grado HPLC, la cual fue filtrada al vacío mediante empleo de un Kitasato con filtro mixed celulosa ester, con tamaño de poro de 0,2 μm y diámetro 47 mm (Advantec MFS).

3.6. Determinación de pigmentos foliares

Para constatar el efecto de la radiación UV-B suplementaria en los pigmentos foliares absorbedores de radiación UV-B y fotosintéticos se analizó la concentración de B-caroteno, clorofilas y flavonoides tales como: Quercetina, Kamferol y Myricetina. Para lo cual se trabajó en hojas de plantas tratadas y control almacenadas a -40° C de acuerdo a lo expuesto en punto 3.4.1. El análisis de pigmentos se basó en protocolo Lichtenthaler y Willburn (1983), modificado (GONZALEZ, 2005), el cual contempló las siguientes etapas: Extracción de pigmentos foliares con metanol P.A, partición con éter de petróleo y metanol acuoso e hidrólisis de flavonoides.

3.6.1 Extracción de pigmentos foliares

La extracción se realizó con metanol P.A en hojas refrigeradas que provenían de hojas frescas, seleccionadas al azar y pesadas (0,8g). El análisis se realizó en un ambiente oscuro iluminado sólo con luz roja (700 nm) para evitar descomposición de los pigmentos. Los 0,80 gramos de cada muestra se depositaron en un mortero, al cual se le agregó 12 mL de metanol P.A y se maceró por algunos minutos a temperatura ambiente. Después con pipeta pasteur se extrajo el sobrenadante y se depositó en tubos centrífuga cubiertos con papel aluminio, los cuales fueron llevados a centrifugación a 4000 revoluciones por 6 minutos (Fig.6).

El sobrenadante, correspondiente al extracto crudo de pigmentos se llevó a espectrofotómetro de doble haz UNICAM (serie UV 500) para obtener su espectro de

absorción desde 200 a 700 nm, utilizando cubeta de cuarzo de 1 cm de paso óptico. Las muestras fueron diluidas 16 veces con metanol P.A para cumplir con la ley de Lamberts-Beer.

3.6.2 Partición con éter de petróleo y metanol

Para separar los pigmentos fotosintéticos de los pigmentos protectores, el sobrenadante se depositó en embudos de decantación para una extracción líquido-líquido agregando volúmenes iguales (10mL) de metanol acuoso 40% y de éter de petróleo. Además a los embudos de decantación se les agregó NaCl P.A para favorecer la diferencia de polaridad entre las dos fases y con ello evitar la formación de una emulsión. Después de agitar el embudo (oscurecido) se dejó reposar para que ocurra la separación en las dos fases durante 24 horas. La fase etérea contiene clorofilas y carotenos y la fase alcohólica los flavonoides (Fig.6). Inmediatamente cada fase se llevó al espectrofotómetro para obtener su absorción espectral (Fig.8). El espectro de absorción de flavonoides se observó entre los 240 y 350 nm y el barrido de pigmentos fotosintéticos alrededor de los 420 y 650 nm.

3.6.3 Hidrólisis de flavonoides

Debido a que en estado natural la mayoría de los flavonoides se encuentran formando glucósidos, la fase alcohólica, correspondiente a los extractos crudos de flavonoides, se sometió a una hidrólisis. Para lo cual la fase alcohólica se evaporó en rotavapor hasta sequedad a una temperatura de 40° C durante 30 minutos. Para que

se produzca la hidrólisis, o sea, la separación de los grupos azúcares, se agregó al matraz 6 ml de solución acuosa de HCl 1M y 4 ml de metanol 100%, esta mezcla se sometió a sistema de calentamiento a reflujo durante 2 horas. Pasadas las dos horas, se dejó enfriar el contenido del matraz y se sometió a extracción líquido-líquido en embudo de decantación con acetato de etilo y agua destilada, agitando y luego dejando en reposo por 24 horas obteniéndose dos fases. La fase orgánica contiene los flavonoides y la fase acuosa los azúcares. La fase orgánica se llevó a sequedad en rotavapor para posteriormente agregar 10 ml de metanol 100%. Antes de leer el espectro a estos flavonoides se mide el pH y se disminuye la acidez a aproximadamente 4.8, agregando Na_2CO_3 al 3%. Las muestras de flavonoides hidrolizadas fueron leídas en espectrofotómetro entre los 200 y 500 nm para observar el desplazamiento de bandas que ocurre producto de la hidrólisis (figura 14).

3.6.4 Determinación de pigmentos fotosintéticos

La determinación de clorofilas se realizó en base a las absorbancias obtenidas en la fase etérea en espectrofotómetro (Fig.8) a longitudes de onda de 666 y 653 nm, utilizando etér de petróleo como blanco. Para el cálculo de las concentraciones de clorofilas se utilizaron las siguientes fórmulas (Lichtenthaler y Willburn, 1983).

Clorofila *a* (ug/mL extracto) = $15,65 \times A_{666} - 7,34 \times A_{653}$

Clorofila *b* (ug/mL extracto) = $27,05 \times A_{653} - 11,21 \times A_{666}$

Siendo A la absorbancia leída a la longitud de onda señalada.

Respecto al *B*-caroteno, éste se analizó en forma cuantitativa mediante técnica HPLC.

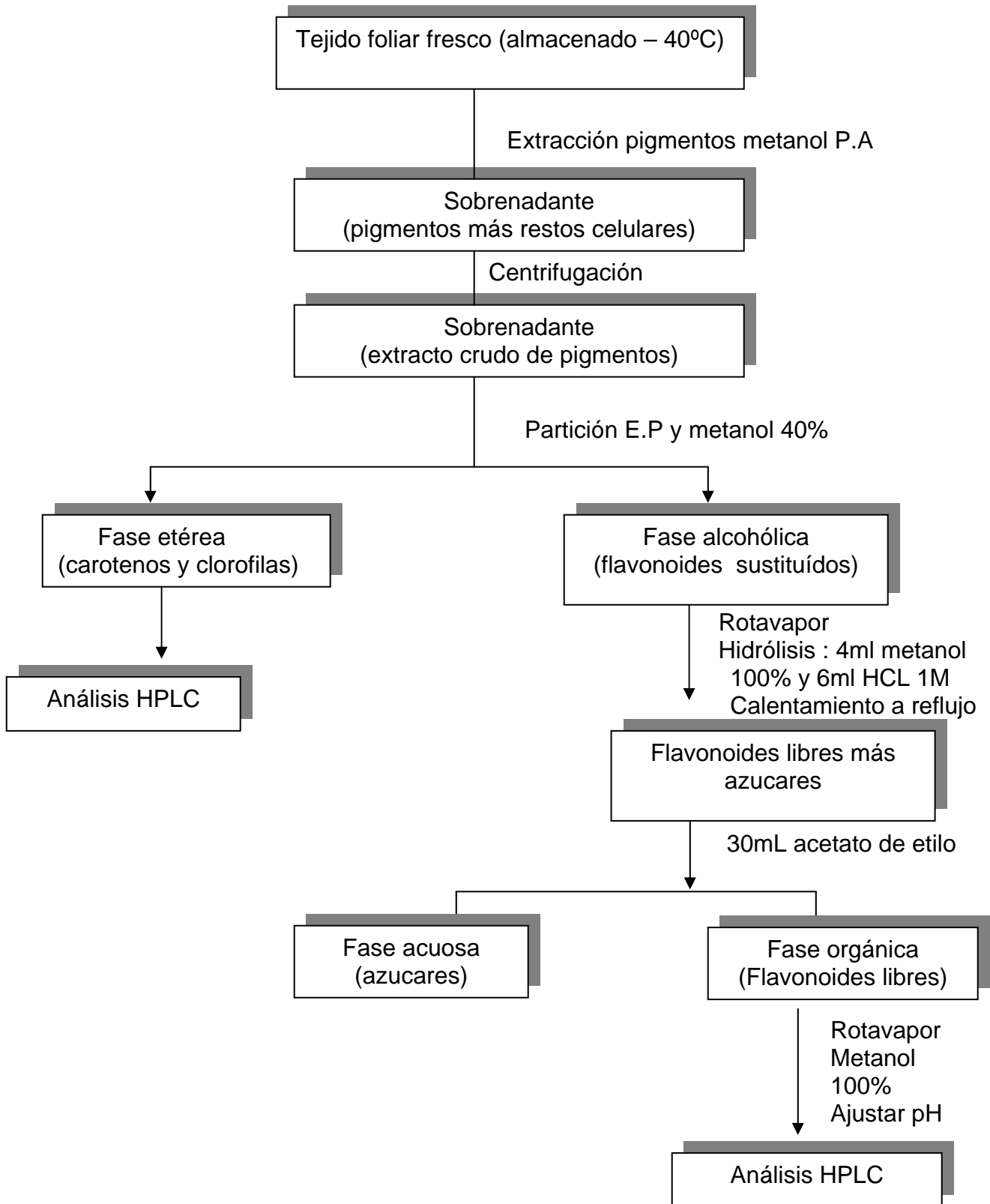


Fig. 6 Extracción, partición e hidrólisis de pigmentos foliares de *Laurelia sempervirens*.



Fig. 7 Cámara de tratamiento en condiciones ambientales de las plántulas de *L. sempervirens* sometidas al suplemento de radiación UV-B ambiental (A) aportado por por cuatro lámparas Philips Q panel, UV 313 (Hanna Instruments Neurtek) y plántulas control desarrolladas bajo radiación solar ambiental (B).

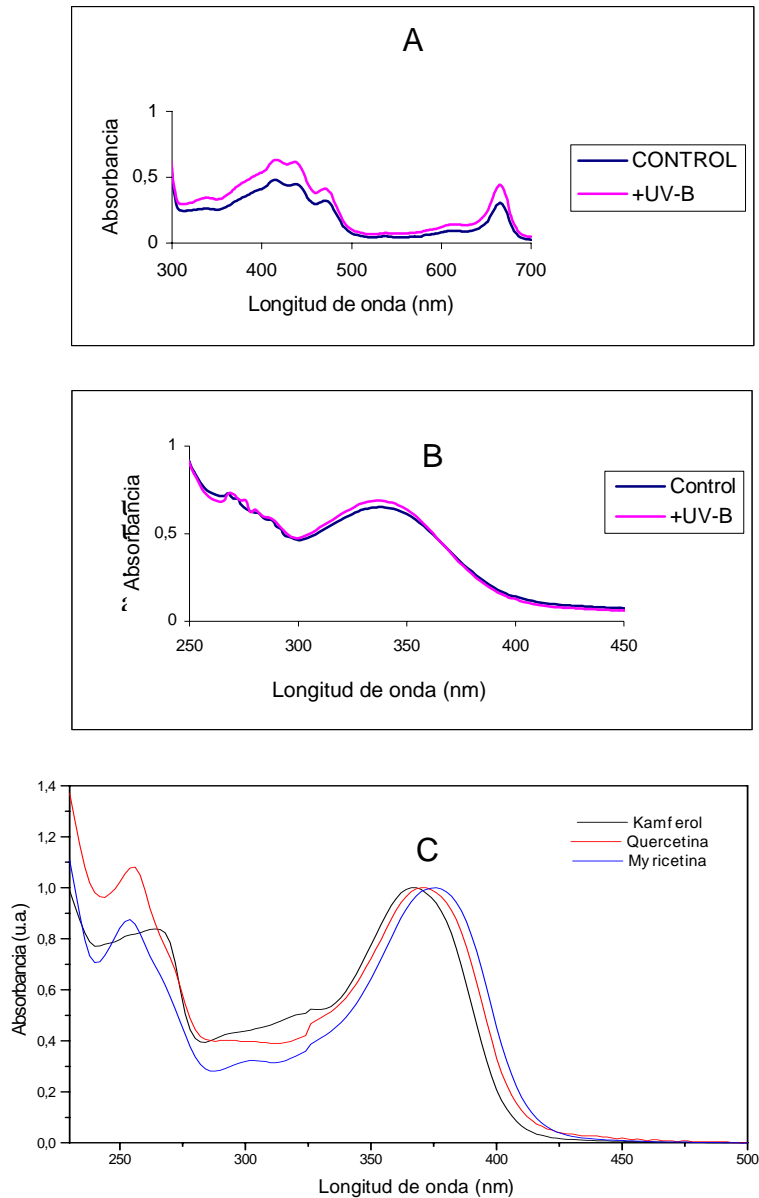


Fig. 8 Espectro de absorción de carotenos y clorofila obtenidos a partir del extracto en éter de petróleo de hojas de *L. sempervirens* tratadas y control. Mediciones para carotenos fueron realizadas a 470 nm de máxima absorción y de clorofilas totales a 666 nm (A); Espectro de absorción de flavonoides obtenidos a partir del extracto en metanol 40% (B) y Espectro de absorción de estándares puros de flavonoides en metanol 100% usados en elección de longitud de onda, para detección y cuantificación de flavonoides por HPLC (C).

3.6.5 Aplicación de Cromatografía Líquida de Alta Resolución (HPLC) en la determinación de pigmentos foliares

La Cromatografía Líquida de Alta Resolución (HPLC) representa el mayor mercado en el mundo del instrumental analítico. La popularidad de esta metodología se debe a su gran versatilidad (ya que cubre un amplio espectro de aplicaciones), excelente capacidad para análisis de trazas (en muchos casos ppb), rapidez, alta resolución y adaptabilidad al análisis cuantitativo. La HPLC se utiliza en casi todos los laboratorios industriales, universidades y en todos los laboratorios donde se realicen investigaciones química o bioquímica. Las aplicaciones de HPLC (particularmente en el área de biotecnología) se están incrementando rápidamente. En los años venideros la HPLC continuará jugando un rol predominante en los laboratorios de investigaciones farmacéuticas, de síntesis orgánica, bioquímicos, biológicos, de control del medio ambiente y alimentarios (QUATTROCCHI et al, 1992; SKOOG, 2001). Por las razones expuestas, y principalmente por sus aplicaciones en el área farmacéutica se utilizó esta técnica.

La técnica se basa en la habilidad de una columna cromatográfica, empacada con una fase estacionaria, para separar los componentes de una mezcla, la cual es disuelta en una fase móvil o eluente, y pasada a través de la columna. Un adecuado sistema de detección continuo localiza los analitos presentes en el eluente midiendo sus propiedades físicas o químicas. Un gráfico de la respuesta del detector en función del tiempo, o volumen del eluente, muestra una serie de picos llamados cromatograma (PUENTES, 2004).

Sobre el 80% de los métodos de análisis por HPLC publicados se realizan usando columnas en fase reversa. En este método, la fase estacionaria es de polaridad menor que el eluyente y los componentes de la muestra son eluidos en orden de polaridad, el componente más polar eluye primero. La retención y la selectividad puede ser alterada por cambio de la polaridad de la fase estacionaria o, (más fácilmente) el eluyente. Dentro de las ventajas del mecanismo de fase reversa se encuentran; separación de muestras de un amplio rango de polaridades, amplia variedad de fases estacionarias, fases móviles relativamente económicas, rápido equilibrio entre fase móvil y la fase estacionaria y dentro de las desventajas; muchas fases unidas a la sílica son estables sólo entre pH 3 y 8, la presencia de grupos silanoles no reactivos en la superficie de la sílica puede causar colas en los picos e incrementar los tiempos de análisis, etc. (PUENTES, 2004).

La elusión de los componentes de una muestra puede realizarse de dos maneras: isocráticamente, es decir; una separación que utiliza un solo disolvente de composición constante, o bien, usando una elusión en gradiente que utiliza dos o más disolventes con polaridad significativamente distinta, variando la relación de los disolventes en forma programada durante el tiempo de elusión (SKOOG, 2001).

Para identificar y cuantificar los distintos pigmentos presentes en los extractos, las dos fases obtenidas (Figura 6) fueron analizadas usando cromatografía líquida de alta resolución (HPLC). La fase alcohólica que contiene los flavonoides hidrolizados fue analizada cuali y cuantitativamente usando HPLC en fase reversa a temperatura ambiente y con un sistema de gradiente de solventes. En la fase etérea que contiene

los carotenos y clorofilas se pudo analizar eficientemente solo el *B*-caroteno, no así las clorofilas por no contar con estándares de buena calidad.

Los pigmentos presentes en los extractos crudos tanto; *B*-caroteno, y flavonoides (Quercetina, Kamferol, Myricetina) fueron analizados cualitativa y cuantitativamente utilizando un equipo cromatógrafo Jasco LC-2000 Plus Chrompass EZ Chromelite, de fase reversa en una columna Kromasil 100-5C18 (150 x 4,60 mm, tamaño de partícula 5 μ m), con un detector de absorbancia de longitud de onda UV-visible y una bomba peristáltica cuaternaria (Fig.9).

Uno de los objetivos de esta tesis fue encontrar un método que permitiera separar en forma eficiente el *B*-caroteno presente en el extracto etéreo de la planta en estudio. Un volumen de 20 μ l de muestra, previamente filtrado con un filtro de teflón (Advantec MFS 0,2 μ m) con el objeto de eliminar las impurezas soluble en el extracto que pudieran dañar la columna, fueron inyectadas a un flujo de 2.0 mL/min, controlado por una bomba peristáltica cuaternaria, a temperatura ambiente y con una longitud de onda de detección a lo 450 nm utilizando un detector UV-visible. La longitud de onda fue elegida de acuerdo a los espectros de absorción de las muestras y estándar (Fig.8) y a la comparación de las alturas, separaciones y resoluciones de los peaks que permitieran una buena identificación y cuantificación del *B*-caroteno presente en la fase etérea de la planta en estudio. Una separación eficiente, acortando el tiempo de separación, se logró usando una gradiente modificada de solventes: acetonitrilo-metanol-buffer Tris HCL 0,1 M pH 8,0 (72:8:3) y metanol-acetato de etilo (40:60) y una corrida isocrática de esta última mezcla de solventes.

La mezcla de solventes acetonitrilo-metanol-buffer Tris HCL 0,1 M pH 8,0, y metanol-acetato de etilo fueron corrida mediante una gradiente lineal hasta 100% de metanol-acetato de etilo en un tiempo de 3 minutos, seguido de 5 minutos de corrida isocrática con metanol-acetato de etilo. Entre cada inyección de muestras la columna fue re-equilibrada, con la primera mezcla de solventes, por un mínimo de 10 minutos, para eliminar los efectos residuales de la mezcla de solventes metanol- acetato de etilo.

Para la separación y determinación de los flavonoides (Myricetina, Quercetina y Kamferol), 20 µl de las muestras (extractos en metanol) previamente filtradas (filtro de tefón Advantec MFS), para eliminar partículas sólidas suspendidas, fueron inyectadas a un flujo de 2 ml /min, controlado por una bomba peristáltica cuaternaria, a temperatura ambiente y con una longitud de onda de detección a 380 nm utilizando detector UV-visible. La longitud de onda fue seleccionada de acuerdo a los espectros de absorción de las muestras (Fig. 8B y 8C), medidas en un espectrofotómetro UV-visible de doble haz (UNICAM UV 500) y a la comparación de las alturas, separaciones y resoluciones de los picos que permitieron una buena identificación y cuantificación de cada uno de los flavonoides en las corridas cromatográfica.

Una separación más eficiente de los flavonoides presentes en el extracto se logró mediante modificación de (VARAS, 2004), con una gradiente de solventes: Solvente A: Agua: ácido acético (99,88:0,12) y solvente B: acetonitrilo: ácidotrifluoroacético (99,85:0,15) y una corrida isocrática de la mezcla solvente A y solvente B (70:30). Entre cada inyección de muestras la columna fue re-equilibrada, con el solvente A, por un mínimo de 10 minutos.

La mezcla de solventes A y B fueron eluidas mediante una gradiente lineal desde un 78% hasta un 70% el solvente A y un 22% hasta 30% el solvente B en 10 minutos, seguido de una elusión isocrática de 5 minutos de los solventes A y B en proporción 70:30.

3.6.6 Identificación, calibración y cuantificación de *B*-caroteno

La identificación del *B*-caroteno de las muestras control y tratadas con radiación UV-B se realizó mediante la comparación de los tiempos de retención de los picos obtenidos para los extractos con los estándares puros de *B*-caroteno en metanol 100%. Los cromatogramas del estándar y de las muestras fueron obtenidos bajo exactamente las mismas condiciones de temperatura, gradiente y flujo (Ver Resultados Fig.15 y 16).

Para cuantificar la banda identificada como *B*-caroteno se realizó una curva de calibración con el estándar (Ver Resultados Fig 17) a concentraciones conocidas: 25, 50,100, 200 ppm. Para cada concentración se consideró un total de 3 inyecciones.

La ecuación de la recta obtenida fue la siguiente:

$$Y= 0,0984X + 0,0018 \quad r^2 =0,997$$

Donde “Y” corresponde al área bajo la curva del pico identificado en el cromatograma, y “X” a la concentración del estándar en ppm.

A partir de estos datos fue posible identificar y calcular cuantitativamente la concentración del *B*-caroteno presente en las muestras en estudio.



Fig. 9 Cromatógrafo utilizado para la identificación y cuantificación de *B*-caroteno y flavonoides. Equipo HPLC Jasco LC-2000 Plus Chrompass EZ Chromelite con columna Kromasil 100-5C18 (150 x 4,60 mm, tamaño de partícula 5 μ m) de fase reversa (A); con detector de absorbancia de longitud de onda UV Visible (B) y una bomba peristáltica cuaternaria (C).

3.6.7 Identificación, calibración y cuantificación de flavonoides

La identificación de flavonoides presentes en las muestras se realizó siguiendo el mismo criterio que en *B*-caroteno. Los cromatogramas de los estándares de flavonoides y de las muestras se obtuvieron bajo iguales condiciones (Ver resultados Fig. 18 y 19).

Para cuantificar la concentración de los flavonoides identificados se realizaron curvas de calibración en HPLC con cada uno de los estándares a concentraciones conocidas: Myricetina, 0,25, 0,5, 0,75 y 1,0 ppm; Quercetina, 10, 25, 50 y 75 ppm y para Kamferol, 15, 20, 30 y 50 ppm (Fig.20). Para cada concentración se consideró un total de 3 inyecciones. Las ecuaciones de la recta obtenida para cada uno de los estándares

fueron las siguientes: Myricetina $Y = 2,640x - 0,100$ $r^2 = 0,998$

Quercetina $Y = 0,5192x - 0,0008$ $r^2 = 0,999$

Kamferol $Y = 0,4558x + 0,0025$ $r^2 = 0,998$

3.7 Análisis estadístico

Con los resultados obtenidos se realizaron análisis estadísticos con el programa computacional Sigma Stat 3,0. Con el fin de determinar si las diferencias entre los resultados eran significativas se realizaron análisis de varianza (ANOVA) de una vía, considerando en ambos grupos de plantas; los parámetros mensuales de crecimiento, peso fresco y seco, estructura foliar y cuantificación por HPLC de flavonoides y *B*-caroteno. Con el Test de Tukey se establecieron si las diferencias entre los resultados eran estadísticamente significativas o no, considerando como diferencias significativas un $P \leq 0,05$ (*).

4 RESULTADOS

4.1 Condiciones ambientales

Las condiciones ambientales a las cuales estuvieron expuestas las plántulas de *Laurelia sempervirens* se muestran en TABLA 1

	A	S	O	N	D	E	F
Precipitación (mm)	226,6	296,4	183,1	164,8	120,4	17,1	27,3
Temperatura media (° C)	8,8	10,0	11,6	14,3	14,3	18,4	17,9
Temperatura máxima (° C)	14,0	14,6	16,9	19,3	19,6	24,5	25,2
Temperatura mínima (° C)	4,8	6,8	7,4	10,3	9,1	13,0	12,6
UV-B _{BE} (μW/cm ² /d)	1,1	2,4	3,4	4,9	6,4	7,7	6,5
PPF(E/m ²)	20,1	25,0	38,0	49,6	59,9	62,3	53,7

TABLA 1 Valores totales mensuales de precipitación, promedios mensuales de temperatura (media, máxima y mínima), de radiación ultravioleta B biológicamente efectiva (UV-B_{BE}) 280-320 nm y de flujo de fotones fotosintéticos (PPF) 400-700 nm, durante los meses de estudio Agosto de 2003 a Febrero de 2004 (meses designados con sus respectivas letras iniciales). Datos climáticos fueron proporcionados por estación metereológica “Isla Teja” UACH y los datos de radiación solar obtenidos del espectroradiómetro de alta resolución (SUV-1 BS Inc) del instituto de Física UACH.

En TABLA 1 se puede apreciar que los meses con mayor número de precipitación y las temperaturas más bajas se registraron en agosto y septiembre del año 2003 y las máximas en enero y febrero del 2004. En general, los meses de agosto a diciembre presentaron altas precipitaciones. Los valores más altos del promedio mensual de la dosis diaria de radiación UV-B biológicamente efectiva (radiación que provoca daño en las plantas) y de flujo de fotones fotosintéticos (PPF) correspondiente a la energía necesaria para realizar fotosíntesis, fueron registradas durante el mes de enero,

4.2 Parámetros de crecimiento en plántulas de *Laurelia sempervirens*

4.2.1 Crecimiento del tallo

En la figura 10 A se representa la curva de crecimiento del tallo de las plántulas de *L. sempervirens* durante el período de tratamiento UV-B. De ella se infiere que el suplemento de radiación UV-B aplicado a las plántulas tratadas inhibió el crecimiento en altura del tallo respecto al de las plantas control presentando ambos grupos de plantas diferencias significativas ($P \leq 0,05$). Al finalizar el experimento la reducción de la altura del tallo por efecto del suplemento UV-B aplicado fue de 23,3% respecto al grupo control.

4.2.2 Número de hojas

La cinética mensual del número de hojas (Fig.10 B) no muestra diferencia estadísticamente significativa entre los meses agosto, septiembre y octubre de las plántulas tratadas (+UV-B) y no tratadas (control). A partir de este mes, durante el inicio del mayor crecimiento del tallo (diciembre y enero), el número de hojas de las plántulas bajo suplemento UV-B disminuye, siendo significativa las diferencias encontradas entre ambos grupos de plántulas. En los dos meses siguientes se observa recuperación en el número de hojas de las plántulas tratadas, encontrándose que al final del tratamiento el número de hojas fue 22,10% más alto que en las plántulas control.

4.2.3 Número de brotes

Las yemas (cubiertas por escamas protectoras) comienzan a crecer y desarrollarse solo a partir del mes de septiembre (Fig. 10 C). El número de brotes durante septiembre y octubre permanece estable, iniciándose en noviembre la elongación de las yemas y el crecimiento de las hojas haciéndose evidente que las plántulas sometidas al tratamiento UV-B presentaron mayor número de brotes, con una diferencia estadísticamente significativa ($P \leq 0,05$) a partir del mes de noviembre.

Al finalizar el tratamiento UV-B, mes de marzo, el número de brotes en las plantas irradiadas fue de un 89 % mayor que el control.

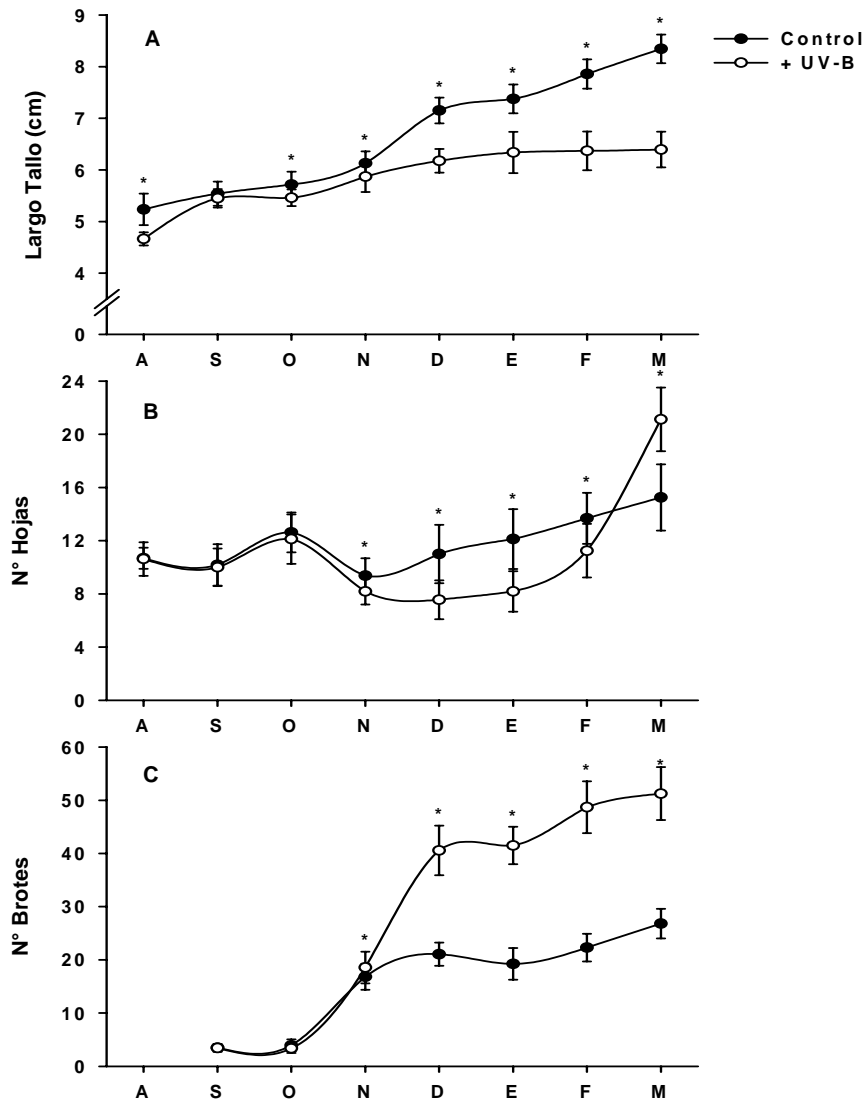


Fig. 10 Efecto de la radiación UV-B ambiental (Control) y del suplemento de radiación ambiental (+ UV-B) en la cinética mensual de crecimiento del tallo (A), número de hojas (B) y número de brotes (C) en plantas de *L. sempervirens* mantenidas bajo condiciones de campo. Los resultados son promedios \pm desviación estándar, $n=16$. Asterisco (*) indica diferencias estadísticamente significativas ($P \leq 0,05$) entre los tratamientos para cada mes.

4.2.4 Biomasa

La biomasa total de las plántulas (Fig.11) fue incrementada significativamente por efecto del tratamiento UV-B en un 3%. Este porcentaje de peso seco se corresponde con la reducción del contenido hídrico que presentaron las plantas tratadas.

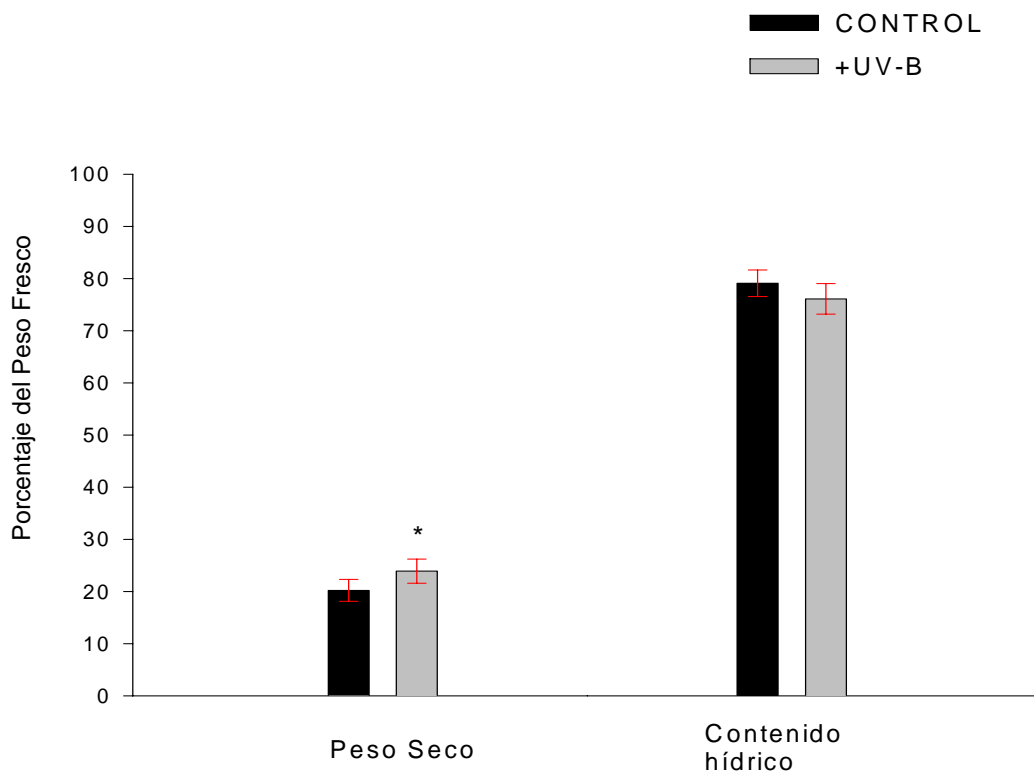


Fig. 11 Efecto del suplemento de radiación UV-B en el Peso seco (%PF) y contenido hídrico (%PF) de plántulas de *L. sempervirens* al término del tratamiento. Los datos representan el promedio de 16 replicas \pm DE. Asterisco (*) indica diferencias estadísticamente significativas ($P \leq 0,05$) entre los tratamientos.

4.2.5 Redistribución de biomasa

La figura 12 presenta el efecto del tratamiento UV-B en la redistribución de los asimilados en los diferentes órganos, respecto al de las plantas control. La biomasa de tallo y raíz fue levemente reducida en un 3 y 2% respectivamente por efecto del suplemento de radiación UV-B a favor de la biomasa foliar que aumentó en un 5%.

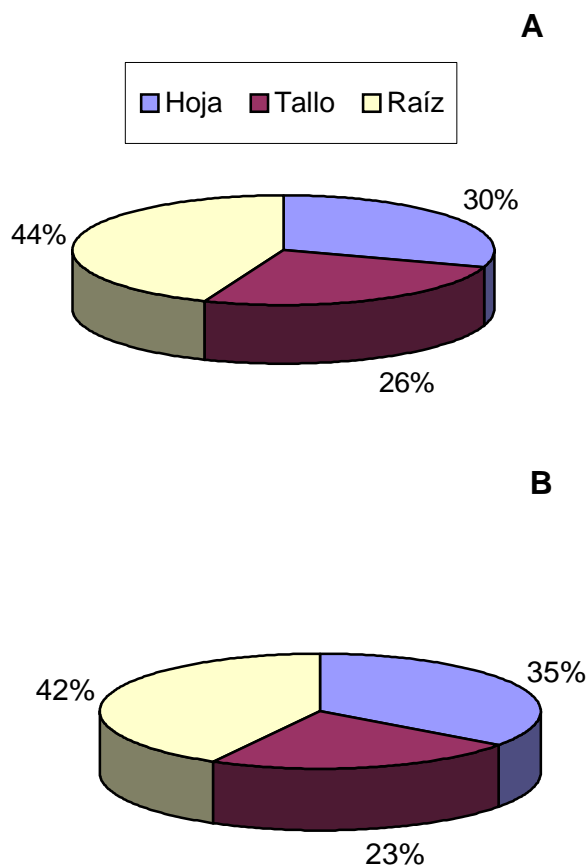


Fig. 12 Redistribución de asimilados en plántulas de *L.sempervirens* después de crecidas y desarrolladas bajo radiación solar ambiental (A) y bajo suplemento de irradiación UV-B ambiental (B). Valores expresados en porcentaje del Peso seco.

4.2.6 Contenido de cenizas de las plantas

La cantidad de ceniza representa los contenidos de nutrientes esenciales (materia inorgánica) presentes en la planta e indirectamente muestra la capacidad de obtención de nutrientes disponibles del suelo. En la TABLA 2 se observa que en las plántulas bajo suplemento UV-B se redujo el contenido de ceniza total (-9,3%) respecto al control, evidenciándose disminución en hojas y tallos (-32,6 y -25,0 % respectivamente) en favor del incremento en raíces (+27,9%).

Cenizas (%PS)			
Órganos	Control	+UV-B	% variación
Hojas	5,43 ± 0,0054	3,66 ± 0,0003	-32,6
Tallos	2,52 ± 0,0004	1,89 ± 0,0013	-25,0
Raíces	4,48 ± 0,0011	5,73 ± 0,0071	+27,9
Total	12,43	11,28	-9,3

TABLA 2 Efecto del suplemento de radiación UV-B en el contenido de cenizas (% PS) de los diferentes órganos de las plantas estudiadas. n=3, ±DE.

4.2.7 Conductividad y pH del suelo

La conductividad eléctrica y el pH de los suelos a nivel radical de las plantas tratadas y control se presenta en la TABLA 3. En ella se aprecia que los suelos de

plantas tratadas poseen una conductividad eléctrica 20% mayor que los de plantas control, lo que indicaría un mayor contenido de nutrientes. La acidez del suelo que influye en la disponibilidad de nutrientes evidencia solo una leve diferencia entre los dos grupos de plantas. El pH_{agua} que corresponde a la concentración actual de protones presentes en la solución del suelo es mayor que el pH_{KCL} que se produce cuando se libera la totalidad de los protones. Al respecto, los resultados muestran leves diferencias entre los suelo. El pH_{agua} en suelos de plantas tratadas con suplemento UV-B es levemente superior al del suelo control, mientras el pH_{KCL} en suelos tratados es levemente menor al control, indicando una mayor acidez.

Características Suelo	Control	+UV-B	% variación
Conductividad eléctrica ($\mu\text{S}/\text{cm}$)	$26,86 \pm 0,93$	$32,25 \pm 1,21$	+20
PH_{agua}	$5,26 \pm 0,053$	$5,28 \pm 0,084$	+0,38
PH_{KCL}	$4,73 \pm 0,017$	$4,62 \pm 0,021$	-2,33

TABLA 3 Conductividad y pH del suelo de cultivo de las plántulas de *L. sempervirens* mantenidas durante 6 meses bajo el suplemento de radiación UV-B ambiental (+UV-B) y ausentes de suplemento (control). Las mediciones se efectuaron a 10 cm de profundidad en la zona radicular al momento de la cosecha de las plantas. $n = 3, \pm \text{DE}$.

4.2.8 Estructura foliar

Las características anatómicas de la hoja, como grosor de cutícula y de los diferentes tejidos además de la densidad estomática se informa en la TABLA 4.

Se aprecia que el grosor total de las hojas de plantas tratadas con suplemento de radiación UV-B incrementó significativamente en un 11,10 % respecto al control, lo que esta fuertemente influenciado por un alto desarrollo del parénquima esponjoso. Respecto a las células del parénquima en empalizada se observó el aumento significativo del ancho (+11,89%) en las plantas +UV-B. En este sentido, el grosor de todos los parámetros considerados, excepto el de la cutícula abaxial, aumentaron en forma estadísticamente significativa con el tratamiento.

Cabe destacar el incremento significativo del número de estomas por efecto del suplemento UV-B (+25,12%) parámetro fuertemente asociado a la transpiración y por lo tanto al contenido hídrico de las plantas.

Características anatómicas	Control	+UV-B	% variación
Cutícula adaxial (um)	3,50 ± 0,24	*3,89 ± 0,32	+11,14
Epidermis superior(um)	28,33 ± 0,85	*29,93 ± 1,52	+ 5,65
Parenquima empalizada (um)	85,8 ± 3,08	*89,21 ± 3,34	+3,97
Parenquima esponjoso (um)	137,77 ± 5,26	*166,32 ± 5,90	+20,72
Epidermis inferior (um)	23,38 ± 0,72	*25,45 ± 1,06	+8,85
Cutícula abaxial(um)	3,36 ± 0,11	3,32 ± 0,064	-1,19
Grosor total hoja (um)	279,14 ± 0,20	*310,12 ± 0,22	+11,10
Densidad estomática (nº/mm ²)	24,92 ± 1,52	*31,18 ± 1,68	+25,12
Ancho célula parenquima empalizada (µm)	19,17 ± 0,58	*21,45 ± 0,73	+ 11,89

TABLA 4 Parámetros morfométricos medidos al microscopio óptico en corte transversal de la lámina foliar de *L. sempervirens* crecidas en condiciones de terreno bajo radiación solar ambiental (control) y con suplemento de radiación UV-B ambiental (+UV-B). Datos representan el promedio de 25 mediciones con 3 replicas y su respectiva desviación estándar. Asterisco (*) indica diferencias estadísticamente significativas ($P \leq 0,05$) entre los tratamientos.

4.3 Análisis de pigmentos foliares en *Laurelia sempervirens*

4.3.1 Extracción y partición de pigmentos foliares

Como resultado de la partición se obtuvieron en la fase etérea clorofilas y carotenos y en la fase alcohólica los flavonoides totales, lo cual cualitativamente se midió en el espectrofotómetro UV-Visible (figura 8 A). El espectro de absorción promedio de carotenos totales se visualizó a 470 nm de máxima absorción y de clorofilas totales a 666 nm, los flavonoides exhibieron dos bandas de absorbancia en la región 240-400 nm. Se observa un aumento evidente en las absorbancias para ambos grupos de pigmentos en las plántulas sometidas a irradiación extra.

Con el fin de esquematizar las máximas absorbancias obtenidas por estos dos grupos de pigmentos en las plántulas tratadas y control se graficaron en la figura 13. Se puede apreciar que el total de los pigmentos analizados presentaron mayores unidades de absorbancia en las plantas tratadas respecto a las control. Así para los flavonoides totales el aumento en la absorbancia fue de un 9,97%, para los carotenos totales un 28,3% y para las clorofilas totales un 45,72%.

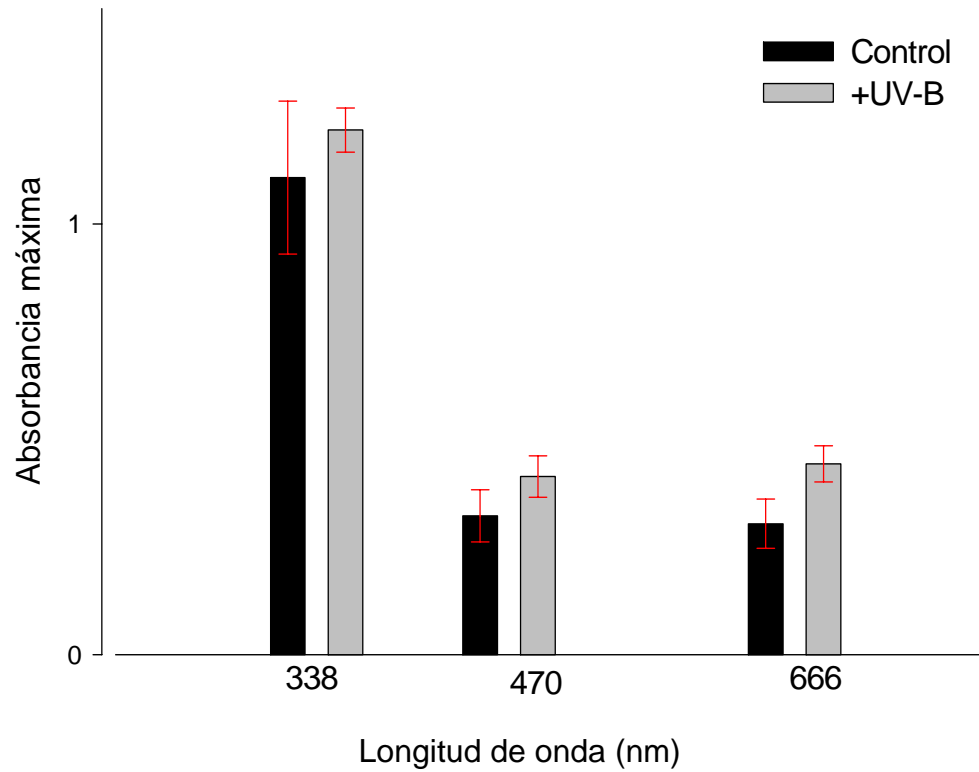


Fig.13 Absorbancia máxima de flavonoides (338 nm), carotenos (470 nm) y clorofilas totales (666 nm) en hojas de plantas de *Laurelia sempervirens* crecidas y desarrolladas bajo radiación UV-B ambiental (control) y bajo suplemento de radiación UV-B ambiental (+UV-B). Datos obtenidos en espectrofotómetro UNICAM UV 500 a una longitud de onda entre 200 a 700 nm. n=4

4.3.2 Hidrólisis

Con el objetivo de separar los grupos azúcares de los flavonoides, la fase alcohólica que contiene los flavonoides totales, se llevó a hidrólisis. Como la molécula resultante de esta hidrólisis es más pequeña, el espectro de absorción de estos flavonoides sufre un desplazamiento de la curva hacia la derecha respecto a flavonoides con grupo azúcar, a mayor longitud de onda, lo cual se puede ver en figura 14.

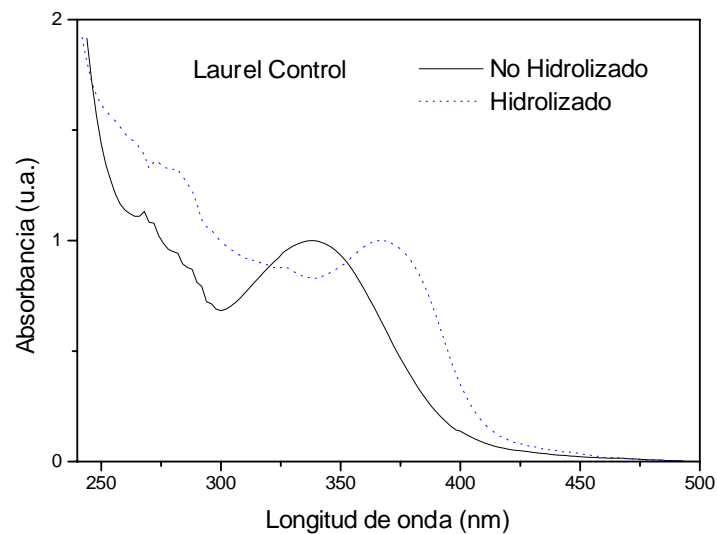


Fig. 14 Espectro de absorción de flavonoides totales no hidrolizados (-) y flavonoides hidrolizados (..) en extracto foliar de *L. sempervirens* mantenida bajo radiación ambiental (control). n=3. Curvas siguen igual tendencia en muestras tratadas con suplemento de radiación UV-B ambiental.

4.3.3 Determinación de clorofila

La determinación de clorofilas totales según según Lichtenthaler y Willburn (1983) en plantas tratadas y control se presenta en la TABLA 5. En ésta se aprecia un aumento de Cl *a* en 30,79% y de Cl *b* en 22,72% para las plantas tratadas respecto a las control.

Concentración clorofila ($\mu\text{g/mL}$)			
Tipo de clorofila	Control	+UV-B	% Variación
Clorofila <i>a</i>	4,618	6,040	+30,79
Clorofila <i>b</i>	1,892	2,322	+22,72

TABLA 5 Concentración de clorofilas ($\mu\text{g/mL}$) en extracto foliar de *L. sempervirens* control y tratadas con suplemento de radiación UV-B ambiental, determinado según Lichtenthaler y Willburn (1983). n=3

4.3.4 Identificación del *B*-caroteno por HPLC

Con el tiempo de retención apreciado en el cromatograma del estándar de *B*-caroteno (Fig.15), se procedió a la identificación de este pigmento presente en el extracto etéreo de plantas tratadas y control (Fig.16), realizando para ello una comparación de los tiempos de retención entre el estándar y las muestras(TABLA 6).

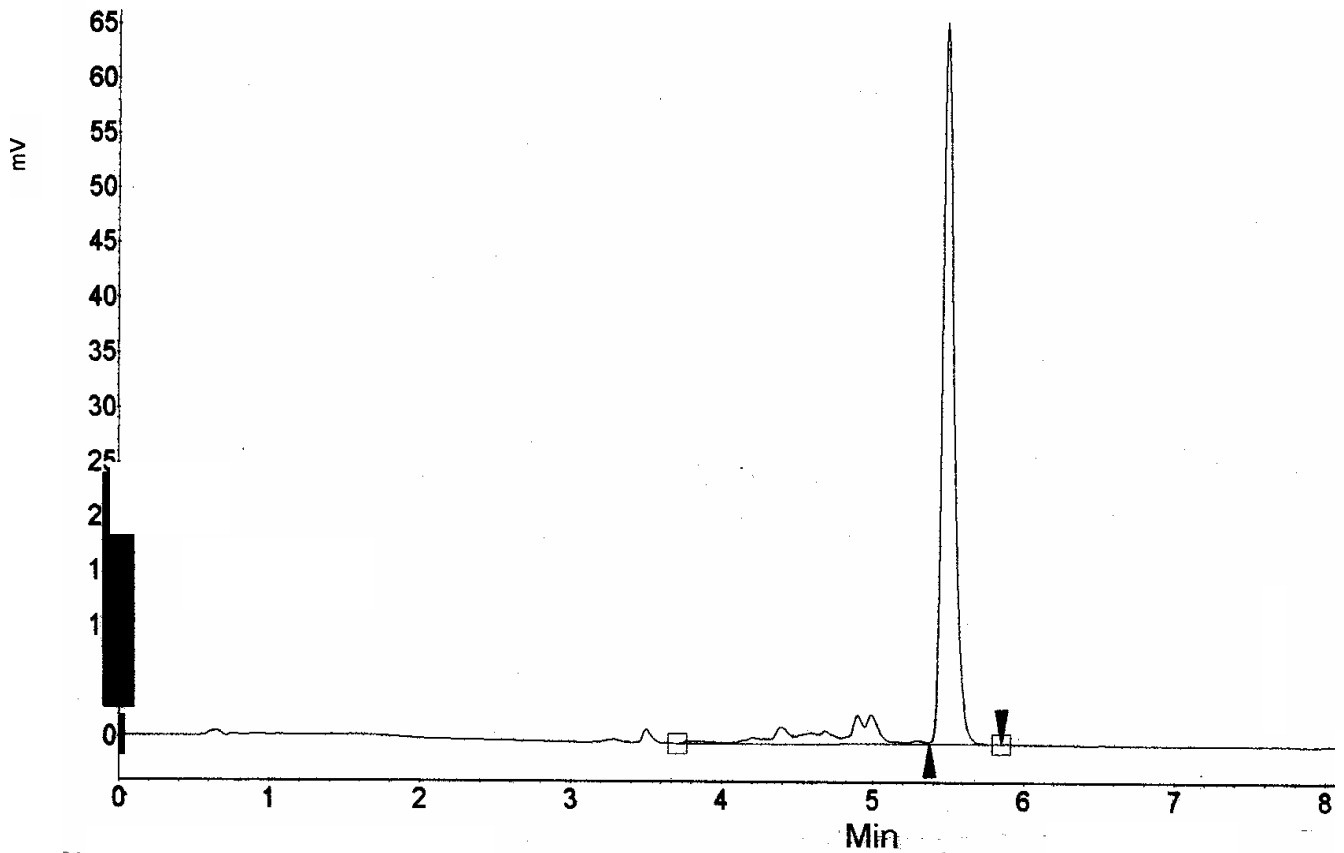


Fig. 15 Cromatograma del estándar de *B*-caroteno, correspondiente a la concentración 50 ppm, resuelto en HPLC fase reversa, con flujo 2,0 mL/min, controlado por bomba peristáltica cuaternaria, a temperatura ambiente y con gradiente de solventes acetonitrilo-metanol-buffer Tris HCL 0,1 M pH 8,0 y metanol-acetato de etilo y corrida isocrática con la última mezcla de solventes. Tiempo de retención del *B*-caroteno 5,47 min.

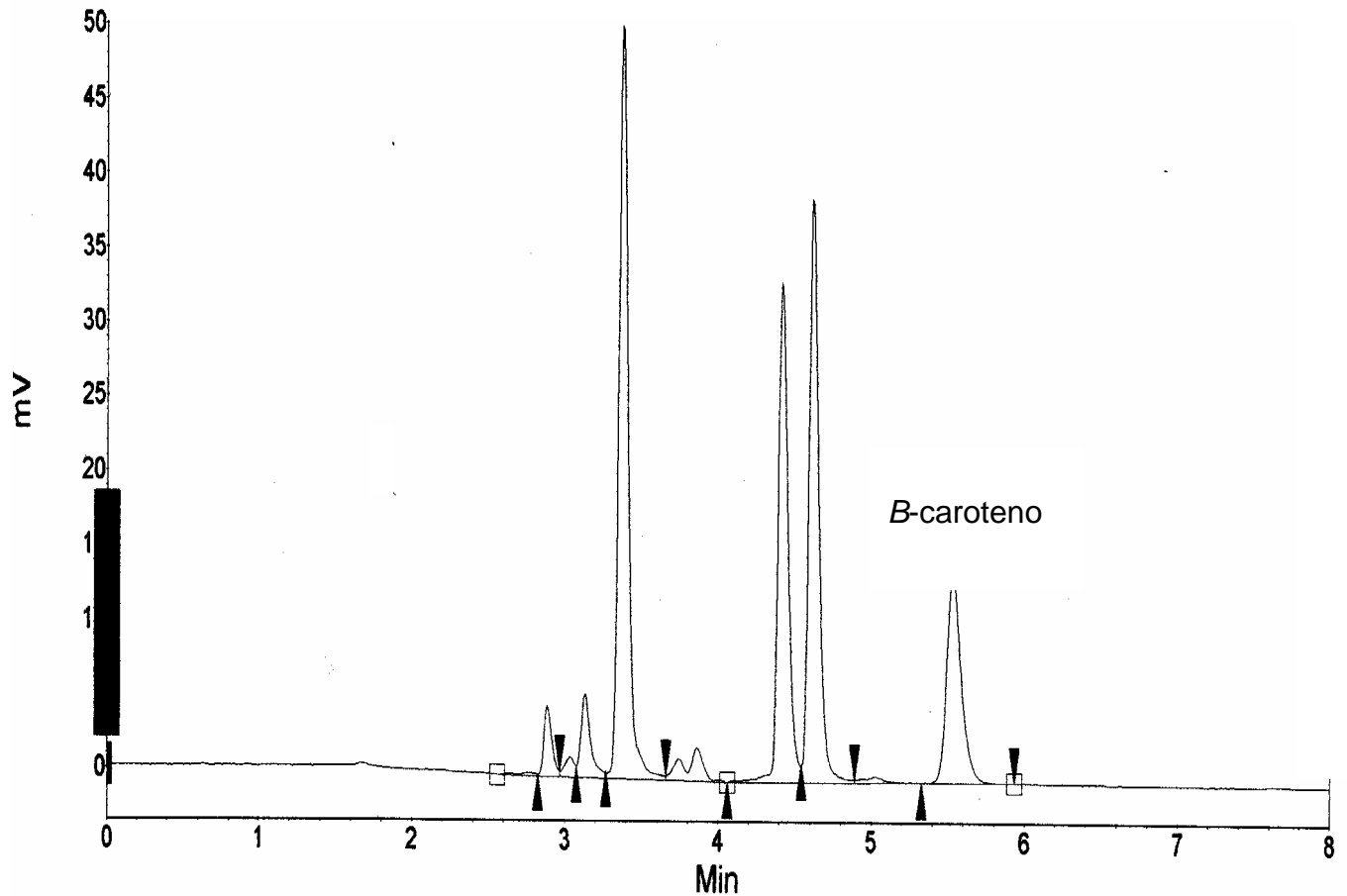


Fig.16 Cromatograma del *B*-caroteno en extracto etéreo de *L. sempervirens*, resuelto por HPLC (Jasco LC-2000 Plus Chrompass EZ Chromelite) fase Reversa. Volumen de inyección de muestra 20 μ l a un flujo de 2,0 mL/min, controlado por una bomba peristáltica cuaternaria, longitud de onda de 470 nm con detector UV-visible, a temperatura ambiente, con gradiente de solventes de acetonitrilo-metanol-buffer Tris HCL 0,1 M pH 8,0 y metanol-acetato de etilo y corrida isocrática con la última mezcla de solventes. Tiempo de retención del *B*-caroteno 5,48 min. Cromatograma correspondiente a muestra control.

Tiempos de retención de <i>B</i> -caroteno (min.)	
Estándar	5,48
Control	5,50
+UV-B	5,49

TABLA 6 Tiempos de retención (min.) de la banda identificada como *B*-caroteno en las muestras en estudio y de su respectivo estándar. N=8

Una vez identificado dicho pigmento en las plantas en estudio se procedió a su cuantificación, utilizando para ello el área bajo la curva del pico identificado y con la ecuación de la recta obtenida en la curva de calibración del *B*-caroteno (Fig. 17) fue posible obtener la concentración de este en las muestras en estudio (TABLA 7), en la cual, se aprecia un aumento significativo de *B*-caroteno de un 12,65 % para las plantas tratadas respecto a su control.

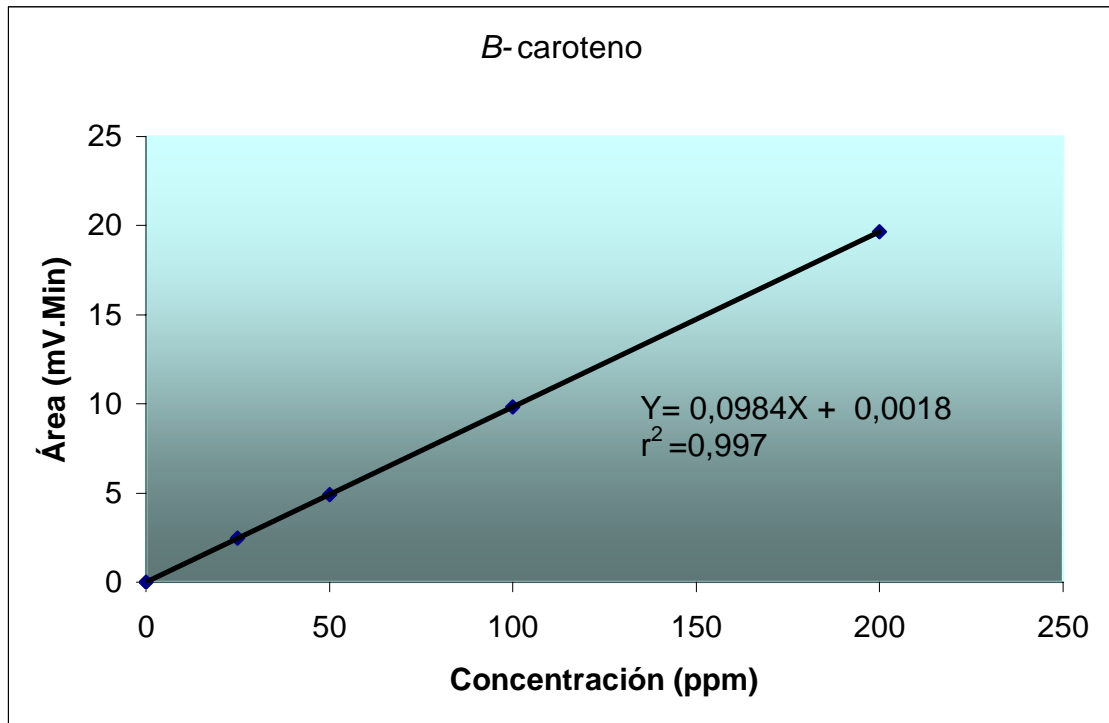


Fig. 17 Curva de calibración del estándar puro de *B*-caroteno , corrido en HPLC fase reversa, de acuerdo a las condiciones señaladas en el capítulo de materiales y métodos.

Muestras	Concentración de <i>B</i> -caroteno (ppm)
Control	85,31 ± 6,83
+UV-B	* 96,10 ± 8,10
Variación (%)	+12,65

TABLA 7 Concentración de *B*-caroteno (ppm) en extracto de hojas de *L.sempervirens* control y tratadas con suplemento de radiación UV-B ambiental, determinado en HPLC. Los datos son promedio de 8 inyecciones para cada muestra con su respectiva desviación estándar. Asterisco (*) representa diferencias estadísticamente significativas ($P \leq 0,05$) entre las muestras para la concentración de *B*-caroteno.

4.3.5 Identificación de flavonoides

La figura 18 representa el cromatograma obtenido para el estándar de Kamferol, una vez obtenidos los demás tiempos de retención de los estándares se procedió a la identificación de los flavonoides presentes en las muestras control y tratadas con suplemento de radiación UV-B ambiental (Fig.19), realizando igualmente una comparación de los tiempos de retención, entre muestras y estándares (TABLA 8). En ambas muestras se determinó Myricetina, Quercetina y Kamferol con tiempos de retención señalados en TABLA 8.

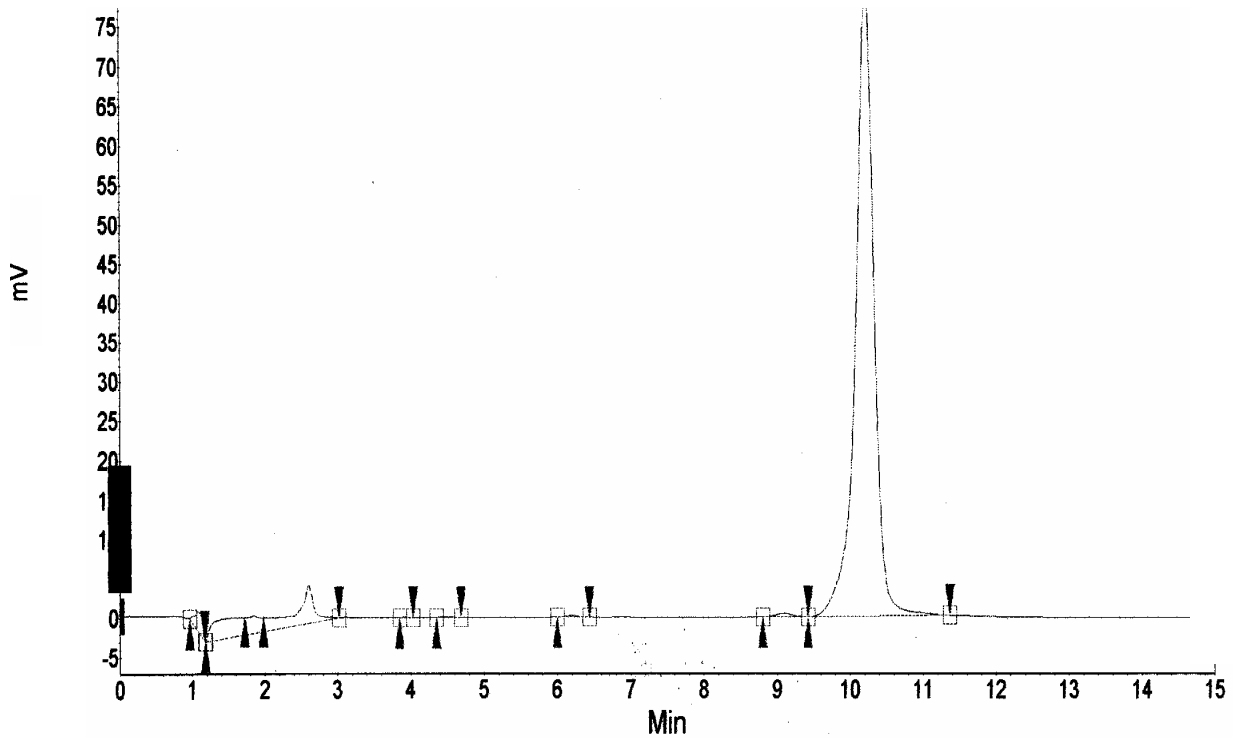


Fig. 18 Cromatograma del estándar metanólico de Kamferol, correspondiente a la concentración 50 ppm, resuelto en HPLC fase reversa, con flujo 2,0 mL/min, controlado por bomba peristáltica cuaternaria, a temperatura ambiente y bajo el siguiente método de separación: gradiente de solvente A (agua:ácido acético) y solvente B (ACN:TFA) a tiempo 0: 78% de A y 22% de B a 70% de A y 30% de B a los 10 minutos. Seguido de corrida isocrática de 5 minutos con esta última mezcla de solventes 70% (A) y 30%(B).

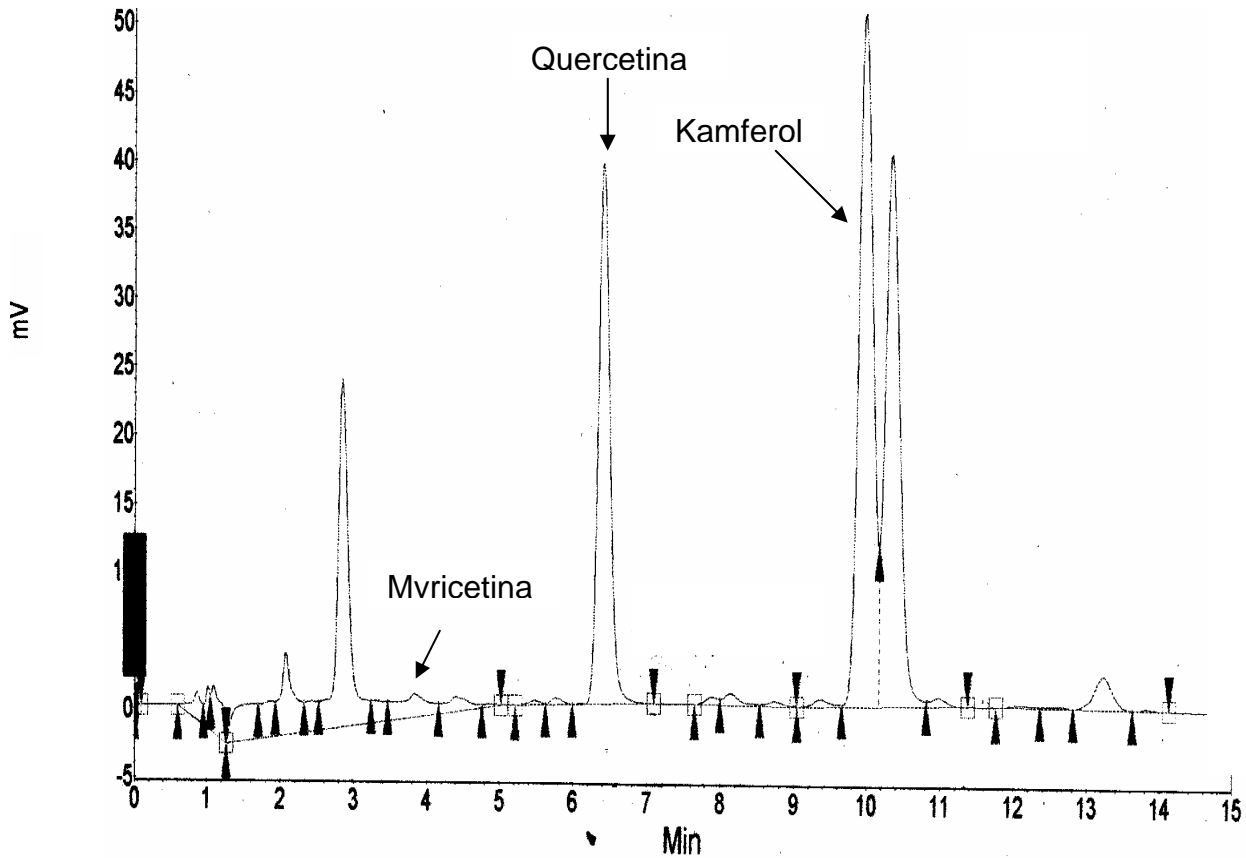


Fig.19 Cromatograma de flavonoides en extracto metanólico foliar de *L.sempervirens*, resuelto por HPLC fase reversa. Volumen de inyección de muestra 20 μ l a un flujo de 2,0 mL/min, controlado por una bomba peristáltica cuaternaria, longitud de onda de 380 nm con detector UV-visible, a temperatura ambiente, con gradiente de solvente A (agua:ácido acético) y solvente B(ACN:TFA) a tiempo 0 78% de A y 22% de B a 70% de A y 30% de B a los 10 minutos. Seguido de corrida isocrática de 5 minutos con esta última mezcla de solventes 70% (A) y 30%(B). Tiempo de retención de flavonoides identificados: Myricetina 3,8 min., Quercetina 6,4 min. y Kamferol 10 min. Cromatograma correspondiente a muestra +UV-B.

	Tiempos de retención (min.)		
	Myricetina	Quercetina	Kamferol
Estándar	3,80	6,42	10,20
Control	3,82	6,40	10,12
+UV-B	3,82	6,41	10,15

TABLA 8 Tiempos de retención (min.) de los flavonoides identificados en las muestras en estudio y de sus respectivos estándares. n=8

Una vez identificados los flavonoides en las muestras estudiadas se procedió a su cuantificación, utilizando para ello el área bajo la curva de las bandas de los flavonoides identificados y con las ecuaciones de la recta obtenidas de las curvas de calibración de los tres estándares (Fig.20) fue posible obtener la concentración de los flavonoides en ambas muestras (Fig.21).

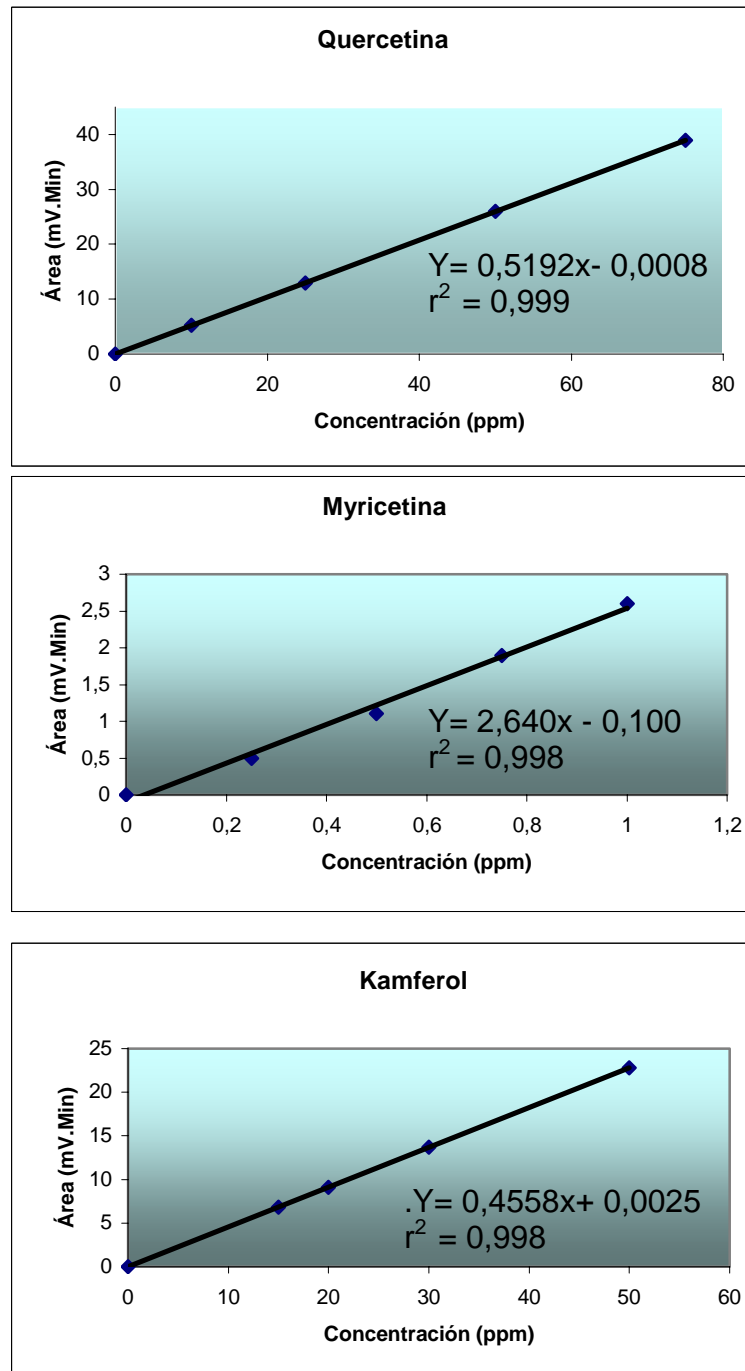


Fig. 20 Curvas de calibración de estándares puros de Quercetina, Myricetina y Kamferol corridos en HPLC fase reversa, de acuerdo a las indicaciones señaladas en el capítulo de materiales y métodos.

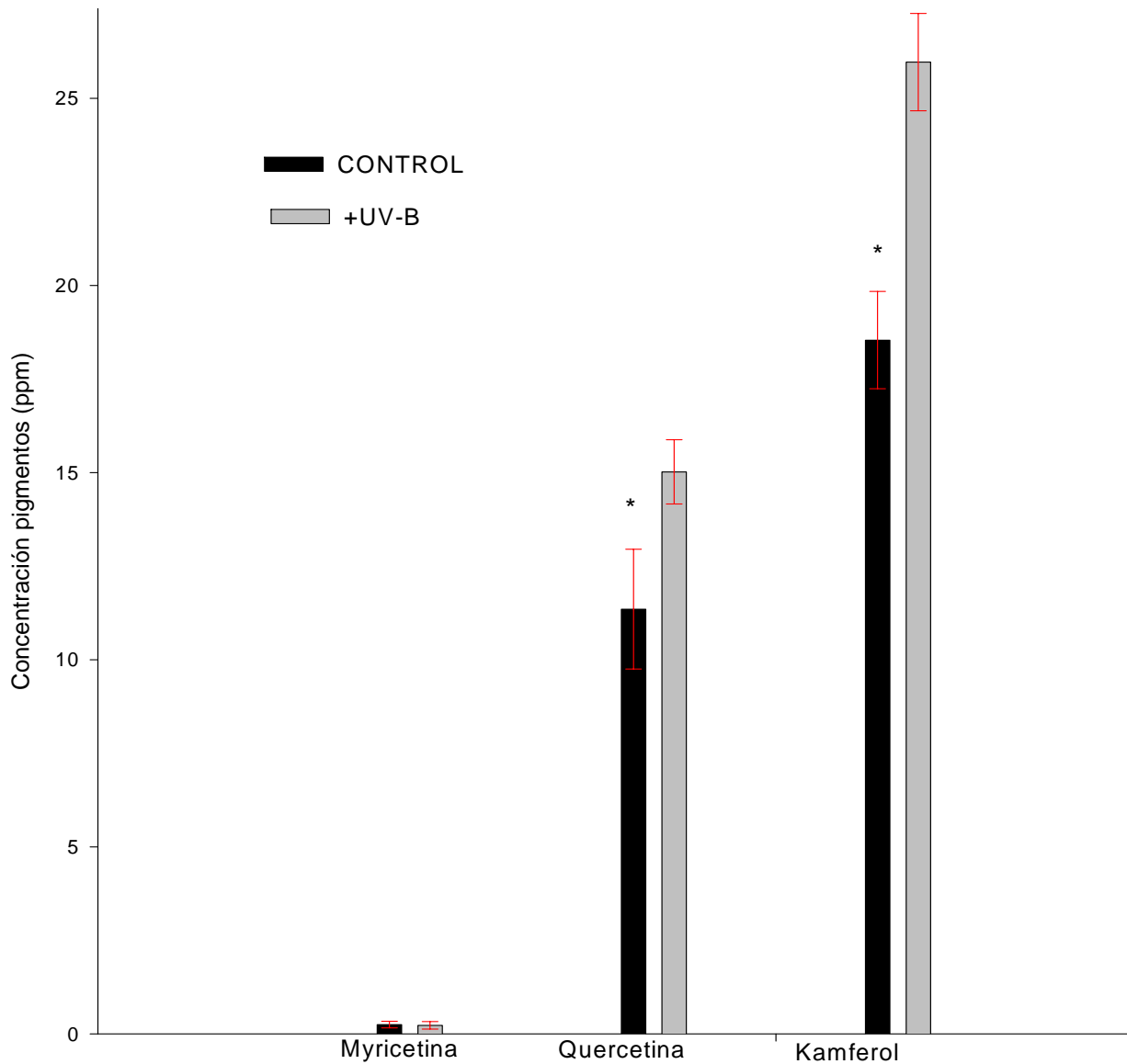


Fig. 21 Concentración (mg/L) de flavonoides en extracto de 0,8 gr. de hojas de *L. sempervirens* control y tratadas con suplemento de radiación UV-B, determinado en HPLC. Los datos representan el promedio de 8 inyecciones para cada muestra con su respectiva desviación estándar. Asterisco (*) representa diferencias estadísticamente significativas ($P \leq 0,05$) entre los tratamientos (control y suplemento +UV-B) para cada pigmento. Los valores de Quercetina incluyen a Rutina hidrolizada. Los estándares de Luteolina y Apigenina no fueron detectados en las muestras estudiadas.

5 DISCUSIÓN

Con la presente tesis se pretendía evaluar el efecto del suplemento de radiación UV-B en el tipo y concentración de pigmentos foliares de amplio uso medicinal a través de técnica HPLC y su relación con el crecimiento y productividad de biomasa de *L. Sempervirens* (árbol siempre verde, nativo del sur de Chile).

La respuesta al suplemento de radiación UV-B de la especie en estudio provocó disminución de altura en las plantas (23%), con una diferencia estadísticamente significativa respecto al control ($P \leq 0,05$). Esto se explicaría con lo informado por DAUBENMURE, (2001) que expresa que la radiación luminosa de onda corta es responsable de la inactivación de Ácido Indol Acético (AIA) o auxina, hormona estimulante del crecimiento, lo cual conlleva a detención en la elongación del tallo. La reducción de la altura del tallo se puede explicar además por el incremento en la síntesis de flavonoides lo que se asocia con control hormonal. Flavonoides monohidroxi en anillo B tales como Kamferol son cofactores de la enzima oxidasa AIA. Enzimas del tipo AIA oxidasa, están involucradas en la degradación de auxinas, controlando de ésta forma el contenido endógeno del AIA en la planta (MEIJKAMP et al.,1999). Por otra parte, flavonoides como Kamferol y Quercetina inhiben el transporte de auxinas a través de la membrana plasmática (MARKHAMM 1975; MCCLURE 1975, STAFFORD 1991). De esta forma alteraciones gatilladas por UV-B en concentraciones de Kamferol y Quercetina pueden llevar a cambios en la actividad y /o concentraciones del AIA. Por otro lado también puede ser directamente destruido el AIA por efecto de la radiación UV-B hacia productos de fotooxidación, los cuales contribuyen a explicar diversos

cambios morfológicos (JANSEN et al., 1998) como hacer más compacta la planta. Lo anterior actuaría como un mecanismo de aclimatación al UV-B (WIZTUM et al. 1978, SINGH 1996).

El número de hojas en esta especie siempre verde, fue muy afectado por el tratamiento. La disminución estadísticamente significativa en los meses de noviembre, diciembre y enero, muestra que el suplemento de radiación UV-B indujo desprendimiento de éstas. La oxidación de las auxinas presentes en las primeras hojas formadas por efecto de la radiación UV-B indujo probablemente esta caída de hojas. La caída de hojas por otra parte sería un mecanismo de aclimatación, lo anterior ha sido informado igualmente por GONZÁLEZ (2005), quien estudió la respuesta de especies arbóreas del centro Sur de Chile (Roble, Raulí y Ulmo) a un suplemento de radiación UV-B. La recuperación del número de hojas al término del tratamiento se asoció con el incremento significativo de brotes (89%) y al desarrollo de estas yemas axilares aumentando así considerablemente la superficie foliar. Esta respuesta implica capacidad de recuperación de esta planta, ya que durante el siguiente período de crecimiento vegetativo, se puede desarrollar un mayor número de ramas laterales. La estimulación del crecimiento de brote axilares, el aumento del número de hojas por efecto de radiación UV-B, ha sido informado por diversos investigadores como BARNE et al., (1988.); JANSEN et al., (1998). Este resultado tiene gran importancia ecológica ya que el número y distribución de hojas afecta el crecimiento y a la competencia por la luz con otras especies (BARNES et al., 1988).

La escasa sensibilidad del Laurel al suplemento UV-B, debido a la efectividad de los mecanismos de resistencia desarrollados, se reflejó en el incremento significativo de biomasa total obtenida durante la cosecha. En general, los resultados obtenidos en distintas especies estudiadas no muestran una tendencia clara ya que responden de manera específica al estrés a que están sometidas. BASSMANN et al., (2003) estudiaron el comportamiento de árboles cultivados bajo tres distintos regímenes de UV-B y encontraron que la radiación más alta redujo la biomasa total en *Pinus ponderosa*, *Picea engelmannii* y *Quercus rubra* mientras que en *Populus trichocarpa* la producción de biomasa aumentó en los dos niveles más alto de radiación.

La redistribución de biomasa obtenida en Laurel mostró aumento de la biomasa foliar a expensas de la biomasa radical y especialmente caulinar por efecto del suplemento UV-B. De acuerdo a KASPERBAUER, (1990) el índice morfológico biomasa subterránea /biomasa aérea o (S/A) permite visualizar las condiciones nutritivas del suelo. En suelos bien nutridos el cociente S/A tiene un valor alto indicando un ambiente fisiológico adecuado para el crecimiento. Los resultados obtenidos en este estudio, según la redistribución de la biomasa en la planta indicarían una relación entre la biomasa subterránea y aérea menor en las plantas sometidas a irradiación extra respecto al control (resultados no mostrados), lo cual indicaría un diferente comportamiento del sistema radical en ambas muestras. Esta hipótesis se sustenta en los valores de conductividad eléctrica medidos en el suelo al finalizar el experimento. El suelo de plantas irradiadas presentó mayores valores de conductividad eléctrica (+20%) que el suelo de las plantas control. Estos resultados indicarían una mayor concentración de iones y/o nutrientes en este suelo. La explicación a esto

podría ser por un lado que la raíces de plantas tratadas no absorben la misma cantidad de nutrientes que las de plantas control y por otro lado que habría mayor cantidad de iones exudados por las raíces de plantas irradiadas. Al respecto la cuantificación total de cenizas de las plantas mostró reducción (-9,3%) por efecto del tratamiento UV-B lo que estaría confirmando la primera de las hipótesis propuestas. Además, el mayor porcentaje de cenizas presentes en las raíces (+27,9) indicarían dificultad en el transporte hacia la hoja. Lo que estaría sustentado por CHAPIN, (1991) y BALLARÉ et al.,(1995). Para estos investigadores la irradiancia global tanto como la radiación ultravioleta regulan en buena medida la cantidad de nutrientes transportados del suelo a las partes aéreas, el reparto selectivo de nutrientes entre diferentes órganos de la planta y la acumulación de carbohidratos productos del metabolismo secundario.

Por otra parte es sabido que el UV-B provoca engrosamiento de la lámina foliar, mecanismo que se asocia con dificultar el paso de la radiación UV-B al interior de la hoja (BORNMAN, 1999; OLSSON et al., 1999). En el engrosamiento estadísticamente significativo ($P \leq 0,05$) de las hojas de Laurel tratadas (+11,10%) se destaca especialmente el incremento de grosor del parénquima esponjoso (+20,7%), el cual corresponde a un tejido con grandes espacios intercelulares que acumulan aire saturado de humedad y que actúa como un aislante térmico. El aumento significativo de grosor de la cutícula adaxial (+11,14%) compuesta preferentemente por ceras disminuye la transpiración cuticular y mejora la función filtradora de radiación UV-B. Esta función es complementada con el incremento de los contenidos de pigmentos absorbentes de UV-B como los flavonoides (BALLARÉ et al 1995; BORNMAN, 1999)

que se acumulan preferentemente en esta lámina y en las ceras epicuticulares depositadas externamente.

Los estomas son estructuras que controlan el intercambio gaseoso y están presentes especialmente en hojas (STEUBING, 2002). El incremento significativo en la densidad de estomas (+25%) en respuesta al tratamiento UV-B encontrado en Laurel permite inferir que la tasa transpiratoria podría ser más elevada que en plantas control. Efectivamente los resultados muestran concordancia con este postulado ya que el contenido hídrico es menor en la plantas tratadas (-2,97%), sin embargo estadísticamente el contenido hídrico no presentó una diferencia significativa. En general, existen evidencias contradictorias respecto al comportamiento de los estomas en respuesta a la radiación UV-B. Así NOGUÉS et al., (1999) han concluido que el incremento de radiación UV-B afecta la apertura de los estomas (cerrando los ostíolos) y disminuyendo su conductancia. Cabe señalar que en el presente trabajo se midió sólo la densidad estomática no así cambios en apertura o cierre.

Los resultados obtenidos en los diferentes parámetros mencionados muestran el desarrollo de eficientes mecanismos de resistencia en *L. sempervirens* al suplemento de radiación UV-B, pudiendo la especie aclimatarse a las condiciones ambientales. Muy asociado con esta resistencia aparecen los pigmentos analizados en este estudio.

Al respecto, los métodos utilizados permitieron determinar la presencia de flavonoides y la identificación de algunos de ellos, de acuerdo a los estándares disponibles y a sus propiedades farmacéuticas, mediante técnicas espectrofotométricas y de HPLC. Al mismo tiempo los métodos utilizados permitieron también la identificación de algunos pigmentos fotosintéticos como B-caroteno y clorofila *a* y *b*.

Los resultados obtenidos mediante espectrofotometría permitieron realizar un análisis cualitativo de los pigmentos a través de sus respectivas absorbancia. El espectro UV de los flavonoides exhibe dos bandas de absorbancia en la región 240-400 nm. Estas dos bandas corresponden ,según literatura, a la banda I (usualmente 300-380 nm) y banda II (usualmente 240-280 nm) (MABRY et al., 1969), lo que concuerda con el espectro obtenido (Fig. 8B y Fig. 14). La banda I se asocia con la absorción del anillo B o sistema cinamoil, y la banda II con la absorción del anillo A o sistema benzoil. Estos resultados muestran mayores absorbancias en las plantas tratadas, lo cual se debería posiblemente a la mayor cantidad de flavonoides totales presentes.

Respecto a los pigmentos fotosintéticos (Fig.8A) se pudo observar el espectro característico de la familia de los carotenoides con su banda espectral entre los 450 y 480 nm y el de las clorofilas con dos picos máximos entre 422 con 666 nm y 475 con 645 nm, lo cual corresponde a clorofila *a* y *b* respectivamente (STRYER, 2002). Al igual que en los flavonoides, estos pigmentos presentaron mayores absorbancia en las plantas tratadas, lo cual probablemente se debería a la razón antes mencionada.

Sin embargo, los espectros de absorción son sólo sugerentes sobre la presencia de determinados pigmentos, incluyendo en el espectro al total de compuestos que absorben en un rango determinado de longitud de onda. Por ello, los enfoques experimentales siguientes fueron la separación e identificación de algunos pigmentos, mediante técnica de HPLC.

De la familia de carotenos se identificó y cuantificó el B-caroteno. Los resultados reflejaron una mayor concentración (ppm) de B-caroteno en la plantas sometidas a radiación extra, lo que equivale a un aumento de 12,65 % respecto a su control,

presentando una diferencia estadísticamente significativa ($P \leq 0,05$). Los pick más altos del cromatograma (Fig.16) probablemente correspondan a clorofilas, así, el primer pick eventualmente podría ser clorofila *a*, puesto que según literatura, esta siempre se encuentra en mayores cantidades dentro de la planta, los dos pick restantes podrían corresponder a otro tipo de clorofilas *b* y *C*, pero al respecto no se podría concluir nada puesto que no se dispuso de estándares para su correcta identificación.

Los carotenoides en la plantas superiores y algas se encuentran en los tilacoides y cloroplastos, la formación de estos pigmentos está ligada al desarrollo de los cloroplastos, estrechamente unida al metabolismo de la clorofila, por su cadena de dobles enlaces conjugados son efectivos aceptores y donadores de electrones, además se relacionan con la reorganización de las estructuras de membrana y con la estimulación lumínica (TAIZ et al., 2002). Por tal razón este aumento en *B*-caroteno contribuiría a la inactivación de las especies reactivas de oxígeno y a la inactivación del estado triplete de la clorofila.

El aumento en la síntesis de pigmentos carotenoides totales en las plantas sometidas a suplemento de radiación UV-B, que se deduce de las mayores absorbancia en las plantas tratadas, como de la mayor cantidad de *B*-caroteno cuantificado, conlleva a una asociación de carotenoides con UV-B. Carotenoides cumplen importantes funciones en las plantas (GOTZ et al., 1999) como filtro natural de luz UV-B, evitan el fotoblanqueamiento de clorofila y actúan como antioxidante inactivando posibles radicales libres generados por no filtración UV-B (GREENBERG et al., 1997). Este aumento en carotenoides coincide con lo reportado por HESS et al.,(2002), donde se

informó que el tratamiento UV-B incrementó el total de pigmentos fotosintéticos en semillas de *Sophora microphylla*. Por otro lado en organismos acuáticos como algas rojas, cyanobacterium se ha estudiado que carotenoides participan en los mecanismos de fotoprotección en condiciones de alta radiación UV, sugiriendo que los carotenoides, en especial, *B*-caroteno y Zeaxantina, tienen un rol protector como antioxidante en la inactivación de radicales inducidos por UV-B en membrana fotosintética (GOTZ et al., 1999). Por lo tanto, lo encontrado en el presente estudio, puede representar una respuesta bioquímica al estrés UV-B aplicado, participando los carotenoides en un rol de fotoprotección de sistemas fotosintéticos.

La determinación de las clorofilas mediante protocolo propuesto por Lichtenthaler y Willburn arrojaron mayores valores en las plantas tratadas, lo que se explica por este incremento en carotenos. Esta respuesta está de acuerdo con resultados obtenidos por MUNNÉ et al., (2000), en el cual se demostró la significancia del *B*-caroteno en la protección de la degradación de clorofila. No hay una relación clara entre clorofila y el aumento de radiación UV-B, al respecto hay resultados discordantes. Sin embargo se ha reportado un aumento en la relación clorofila *a/b*, por el hecho de que la radiación UV-B afectaría preferentemente a la clorofila *b* (Kulandaivelu et al. 1996), lo que concuerda con el mayor aumento en *cl a* obtenido en el presente estudio.

Previo a la identificación de los pigmentos absorbedores de radiación UV-B por HPLC, el extracto alcohólico de flavonoides se llevó a hidrólisis obteniéndose en el barrido espectral un desplazamiento de las curvas hacia la derecha a mayores longitudes de onda (Fig.14), debido entre otras causas al menor tamaño de la molécula resultante de la hidrólisis. Además, como resultado de esta hidrólisis se obtiene un

incremento en las hidroxilaciones del anillo B, lo cual produce un notable efecto batocrómico en la banda I (MABRY et al., 1969).

En cuanto al análisis cuantitativo de los flavonoides realizado por HPLC se encontró un aumento de un 32,33 % para Quercetina y un 40,07 % para Kamferol, presentando ambos pigmentos una diferencia estadísticamente significativa respecto al control ($P \leq 0,05$). No así Myricetina que disminuyó en un 8 % en las plantas tratadas con radiación UV-B respecto a su control, diferencia que no fue estadísticamente significativa. El orden de elusión de Myricetina, Quercetina y Kamferol (Fig.19) es gobernado por la más alta polaridad de Myricetina (3,3',4',5,5',7- hexahidroxiflavona) dado por el mayor número de grupo hidroxilos en su molécula, seguido de Quercetina (3,3',4',5,7-pentahidroxiflavona) y Kamferol (3,4',5,7-tetrahidroxiflavona). El pick cercano a Kamferol, siguiendo este mismo criterio, podría ser un flavonoide de menor polaridad, como por ejemplo, Acacetina. Estudios similares, empleando la misma técnica de análisis de flavonoides realizados por HUCK et al., (2001) han reportado este flavonoide muy cercano al Kamferol.

Es sabido que como respuesta específica de flavonoides al suplemento de radiación UV-B se ha observado un incremento global de la cantidad de estos compuestos, gatillandose la biosíntesis de flavonoides por la exposición de radiación UV-B. Esta radiación estimula la síntesis de la enzima fenil alanina amonia liasa (PAL) y chalcona sintasa (CHS), enzimas involucradas en la biosíntesis de estos compuestos (BALLARÉ et al., 1995; BORNMAN, 1999; MEIJKAMP et al, 1999). Algunos de los flavonoides sintetizados pueden también actuar como verdaderos antioxidantes atrapando especies activas del oxígeno como singlete de oxígeno, superóxido y

radicales peróxido, además de prevenir el fotoblanqueamiento de carotenoides por Kamferol y Quercetina (BRUNN et al., 1992).

Similares respuestas de aclimatación al incremento de radiación UV-B se ha reportado en otros estudios (HESS, et al., 2003), quienes determinaron incremento en el contenido de flavonoides del tipo Kamferol en *S.microphylla* y Quercetina en *S.stipulacea*. OLSSON et al., (1998) estudiaron la respuesta diferencial de flavonoides al aumento de radiación UV-B en *Brassica napus*, en la cual encontraron aumentos significativos en la concentración de flavonoides del tipo tri y tetra- hidroxiflavonoles como Kamferol y Quercetina. En este caso el aumento en Quercetina fue mayor que el de Kamferol. Por el contrario en el presente estudio se obtuvo un mayor aumento en Kamferol (40,07%) respecto a Quercetina (32,33%). Quercetina por poseer un grupo adicional orto- dihidroxil en anillo B, tiene un mayor potencial en la actividad antioxidante. Se ha visto *in vitro* que Quercetina tiene mejores propiedades atrapadoras de superóxidos que Kamferol (TOURNAIRE et al., 1993), razón por la cual se hubiese esperado un efecto más marcado en éste flavonoide.

No se identificó mediante técnica HPLC los flavonoides (flavonas) luteolina, ni apigenina, lo que indicaría que estos flavonoides no tienen en este caso un rol directo sobre la filtración de radiación UV-B. La exposición de plantas al incremento de radiación UV ha demostrado un incremento tanto en la síntesis de flavonas y flavonoles (TAIZ, 2002). Lo que sugiere que cada especie se adapta indistintamente al exceso de radiación.

La bibliografía examinada no describe la presencia de flavonoides en esta especie, por lo que por primera vez se estaría reportando la presencia de estos compuestos en *Laurelia sempervirens*. Los antecedentes bibliográficos acerca de la composición química de *L. sempervirens* principalmente señalan alcaloides y aceites esenciales, por lo que esto podría contribuir a ampliar su uso medicinal o bien a explicar los usos medicinales ya descritos, como lo es, el uso del infuso de hojas de laurel como digestivo, antiinflamatorio. A los flavonoides se les reconocen acciones antiinflamatoria y analgésica por su interacción con enzimas implicadas en el metabolismo del ácido araquidónico (VILLAR, 1999), a la acción digestiva probablemente contribuyen los flavonoides presentes en esta planta como lo es la Quercetina muy útil para eliminar ciertas dolencias digestivas relacionadas con el hígado, como la sensación de plenitud o los vómitos (MARTINEZ, 1999). Otro uso medicinal de esta planta que se podría explicar por la presencia de flavonoides sería el uso como diurético, ya que flavonoides sobre todo derivados de flavonas y flavonoles (VILLAR, 1999) ejercen una importante acción diurética.

Adicionalmente, los flavonoides identificados en este estudio podrían contribuir a nuevos usos de esta planta, así por ejemplo, para insuficiencia venosa especialmente Rutina y Quercetina. Cabe señalar que si bien no se determinó Rutina como tal, debido al proceso de hidrólisis, ésta igualmente podría estar presente en los valores correspondiente a Quercetina, puesto que en el proceso de hidrólisis la molécula de Rutina (Quercetina sustituida) se convierte en Quercetina. Quercetina según CADENAS (1996), mostró ser, *in vitro*, un poderoso agente antiproliferativo de células anticancerosas humanas y exhibió efectos sinérgicos antiproliferativos con algunos

agentes terapéuticos como cisplatino y adriamicina. Además este flavonoide puede inducir apoptosis en células tumorales humanas. Por ello se hace evidente profundizar estas investigaciones respecto de los efectos anticancerígenos de los flavonoides para su óptimo aprovechamiento.

Finalmente en este estudio se confirma la acción como atrapadores eficiente de fotones de longitud de onda corta (UV-B) de los flavonoides Kamferol y Quercetina. Ellos forman parte de muchas preparaciones cosméticas ya sea filtros solares, vitaminas, cremas antiaging, etc. A su vez sería interesante la potencial incorporación de flavonoides UV-B inducidos en tratamientos contra el cáncer de piel, tomando en cuenta el gran aumento de esta enfermedad en los últimos años.

6 CONCLUSIÓN

De acuerdo a los resultados obtenidos en esta investigación y bajo las condiciones en que se realizaron los experimentos se puede concluir lo siguiente:

Se confirma la hipótesis de esta investigación en el sentido que la cantidad de pigmentos foliares (filtradores y fotosintetizadores) incrementaron por efecto del suplemento UV-B ambiental, lo que se relacionó positivamente con la productividad de biomasa de la planta.

La resistencia de las plantas de *L. sempervirens* al tratamiento de suplemento UV-B ambiental se asoció con el desarrollo de mecanismos de aclimatación, tales como: engrosamiento de lámina foliar, caída prematura de hojas, síntesis de pigmentos absorbedores y detención del crecimiento del tallo.

El suplemento de radiación UV-B ambiental indujo variación en la absorción y traslado de nutrientes.

El suplemento de radiación UV-B ambiental indujo en *L. sempervirens* síntesis de clorofilas, carotenoides totales y flavonoides determinándose un aumento significativo en la concentración de *B*-caroteno, Quercetina y especialmente Kamferol, siendo estos pigmentos de gran uso medicinal.

Finalmente se concluye que este trabajo aporta un método para mejorar la productividad de algunos componentes de gran potencial farmacéutico, en especies vegetales nativas y postula una interesante línea de investigación.

7. GLOSARIO

- Abaxial:** Parte de un órgano más alejado del eje de la planta, en una hoja es el envés.
- Adaxial:** Parte de un órgano más próximo con respecto a un eje, en las hojas corresponde al haz o cara superior.
- Antiproliferativa:** Que actúa en contra del crecimiento y la división de células.
- Atonía :** Falta de la fuerza o tono normal, especialmente de un órgano contráctil.
- Biomasa:** Materia seca que puede ser expresada por unidad de área, volumen o peso.
- Batocrómico:** Cuando la longitud de onda de absorción de una sustancia se desplaza hacia longitudes de onda más grandes o de menor energía por efecto del solvente o por sustituyentes.
- Diurético:** Que aumenta la secreción de orina.
- Digestivo:** Que favorece la digestión.
- Silicosis:** Enfermedad pulmonar causada por inhalación de dióxido de silicio o polvo de sílice cristalino sin la protección adecuada.
- Siempre verde:** Especie vegetal que presenta hojas durante todo el año.
- Ozono:** Gas cuyas moléculas contienen tres átomos de oxígeno y cuya presencia en la estratósfera constituye la capa de ozono.

8. BIBLIOGRAFÍA

Aiken, S.G., Lefkovitch, L.P. 1984. The taxonomic value of using epidermal characteristics in the canadian rough fescue complex (*Festuca altaica*, *F. Campestris*, *F. hallii*, *F. scabrella*). *Canadian Journal of Botany* 62:1864-1870.

Arnaud, J.V. 2003. La clorofila energía vital. *En Buenas Manos*.
<http://www.enbuenasmanos.com/articulos/muestra.asp?art=540>

Ballaré, C.L., Scopel A.L and Sánchez R.A. 1995. Plant Photomorphogenesis in Canopies, Crop Growth and Yield. *Hort Science* 30:1172-1181.

Barnes, P.W., Flint, S.D., Caldwell, M.M. 1990. Morphological responses of crop and weed species of different growth forms to ultraviolet-B radiation. *American Journal of Botany* 77(10): 1354-1360.

Bassman, J.H., Edward, G.E., Robberecht, R. 2003. Photosynthesis and growth in seedlings of five forest tree species with contrasting leaf anatomy subjected to supplemental UV-B radiation. *Forest Science* 49(2):176-187.

Beegs, C.J., Stolzer-Jehle, A., Wellmann, E. 1995. Isoflavonoids formation as an indicator of UV stress in bean (*Phaseolus vulgaris* L.) leaves. *Plant Physiol.* 79:630-634.

Bendich, A., Olson, J. 1989. Biological action of carotenoids. *The FASEB Journal* 3:1927-1932.

Björn, L.O. 1999. Ultraviolet-B radiation, the ozone layer and ozone depletion. *Stratospheric ozone depletion: the effects of enhanced UV-B radiation on terrestrial ecosystems*. Rozema, J (ed). Backhuys Publishers, Leiden, The Netherlands. Pp. 21-37.

Bravo, L, Alberdi, M, Corcuera, L.. 2001. Resistencia a la alta intensidad lumínica y frío en plantas antárticas. *Gayana Bot.* 58(1):47-101.

Britton, G. 1995. Estructura y características de los carotenoides en lo referente a la función. *Asebj.* 1: 1551-1558.

Bornmam, J.F. 1999. Localisation and functional significance of flavonoids and related compounds. *Stratospheric ozone depletion: the effects of enhanced UV-B radiation on terrestrial ecosystems*. Rozema, J (ed). Backhuys Publishers, Leiden, The Netherlands. Pp.59-69.

Brunn, S.A., Muday, G.K., Haworth, P. 1992. Auxin transport and the interaction of phytohormones. *Plant Physiology*, 98: 101-107.

Cadenas, E. 1999. Sustancias flavonoides en: Antioxidantes y calidad de vida Online. <http://www.antioxidantes.com.ar/12/home2.htm>.

Carreño, V., Redondas, A., Cuevas, E. 2003. Índice UV para la población. 1ª edición, Madrid (España).

Cen, Y.P., Weissenböck, G., Bornman, J.F. 1993. The effects of UV-B radiation on phenolic compounds and photosynthesis in leaves of *Brassica napus*. *Physical, biochemical and physiological effects of ultraviolet radiation on Brassica napus and Phaseolus vulgaris*. Lund, Sweden, ISBN 91-628-1051-0.

Daubenmure, R.F. 2001. Ecología vegetal: tratado de autoecología de plantas. México, Noriega. 496 p.

Day, T.A. 1993. Relating UV-B radiation screening effectiveness off foliage to absorbing compound concentration and anatomical characteristics in a diverse group of plants. *Oecologia*. 95: 542-550.

Day, T.A., Vogelmann, T.C., DeLucia, E.H. 1992. Are some plant life forms more effective than others in screening out ultraviolet-B radiation? *Oecologia*. 92: 513-519.

Delgado, V.F., Paredes, L.O. 2003. *Natural Colorant for Food and Nutraceutical Uses*, CRC Press, Boca Raton, Florida, US.

Di Castri, F and Hajek, E. 1976. Bioclimatología de Chile. Ediciones Univeridad Católica de Chile. Santiago. 128 p.

Epstein, J. 1976. Effects of B-caroteno on ultraviolet induced cancer formation in the hairless mouse skin. *Photochemistry and Photobiology*, 25: 211-213.

García, M., Armenteros, D.M., Mahía, M., Coma,C., Hernández, J., Díaz, A., Fernández, J. 2002. Plantas cítricas en el tratamiento de enfermedades vasculares. *Rev. Cubana Angiol. Y Cir. Vasc.*; 3 (2): 39-46.

González, R.A. 2005. Efecto del suplemento de radiación UV-B en el crecimiento y desarrollo de tres especies arbóreas nativas del Sur de Chile. *Tesis de grado presentada como parte de los requisitos para optar al Grado de Licenciado en Ciencias Biológicas*. Facultad de Ciencias de la Universidad Austral de Chile.120 p.

Gotz, T., Windhovel, P and Sandman, G. 1999. Protection of photosynthesis against ultraviolet-B radiation by carotenoids in transformants of the cyanobacterium *Synechococcus PCC7942*. *Plant Phyiol.* 120: 599-604.

Hertog, G.L., Hollmna, C.H., Katan, B. 1992. Content of potentially anticarcinogenic flavonoids of 28 vegetables and 9 fruits commonly consumed in the netherlands. *J. Agric. Food Chem* 40:2379-2383.

Hernández, R. 2001. Libro Botánica online. <http://www.Forest.ula.ve/> rubenhg

Jansen, M., Gaba, V, Greenberg, B.M. 1998. Higher plants and UV-B radiation: balancing damage, repair and acclimation. *Trends in Plant Science* 3:131-135.

Hess, S., Alvarez, L., Iturra, G., Romero, M. 2002. Evidence of UV-B differential response in *Sophora microphylla* from shady and sunny places. *Soc. Chil. Quim.* 47, 501-510.

Hess, S., Romero, M., Barría, P. 2003. Efecto del UV suplementario en la transpiración de *Sophora microphylla* y *Senna stipulacea*. XLVI Reunión anual de la Sociedad de Biología de Chile.

Higashi-Okai, K., Okai, Y. 1998. Potent suppressive activity of chlorophyll a and b from green tea (*Camelia sinensis*) againsts tumor promotion in mouse skin. *Cáncer lett*, 20(3): 181-188.

Hoffmann, A. 1997. Flora silvestre de Chile, zona araucana. Ediciones Fundación Claudio Gay. Santiago, 258 p. 4^a Edición.

Huck, C.W., Buchmeiser, M.R., Bonn, G.K. 2001. Fast analysis of flavonoids in plant extracts by liquid chromatography-ultraviolet absorbance detection on poly (carboxylic

acid)-coated silica and electrospray ionization tandem mass spectrometric detection.

Journal of Chromatography A, 943:33-38.

Husain, S.R., Cillard, J., Cillard, P. 1987. Hydroxyl radical scavenging activity of flavonoids. *Phytochemistry*, 26: 2489-2491.

Karabourniotis, G., Bornman, J.F. 1999. Penetration of UV-A, UV-B and blue light through leaf trichome layers of two xeromorphic plants, olive and oak, measured by optical fibre microprobes. *Physiologia Plantarum*, 105: 655-661.

Karnaukhov, 1990. Carotenoids: recent progress, problems and prospects. *Comp. Biochem. Physiol.* 1: 1-20.

Kasperbauer, M.J. and. Hunt P.G. 1990. Phytochrome Regulation of Morphogenesis in Cotton Under Field Conditions. *Agron. Abst.* 124-125.

Kulandaivelu, G., Lingakumar, K., Premkumar, A. 1996. UV-B radiation. In: *Plant Ecophysiology*. (ed). Prasad, M., John Wiley and Sons, Inc. India. Pp 41-60.

Lichtenhaler, H., Welburn, A. 1983. Determination of total carotenoids and chlorophylls *a* and *b* of leaf extracts in different solvents. *Biochem. Soc. T*, 11: 591-592.

Liu, L., Gitz III D.C., McClire, J.W. 1995. Effects of UV-B on flavonoids, ferulic acid, growth and photosynthesis in barley primary leaves. *Physiologia Plantarum*, 93: 725-733.

Lovengreen, C., Fuenzalida, H and Villanueva, L. 2000. Ultraviolet solar radiation at Valdivia, Chile (39,8° S). *Atmospheric Environment*. 34:4051-4061.

Mabry, T.J., Markham, K.R., and Thomas M.B. 1969. The systematic identification of flavonoids. Springer-Verlag, New York. 354 p.

Martínez, F.J., Gonzalez, J.M., Tuñon, M.J. 2002. Los flavonoides: propiedades y acciones antioxidantes. *Nutr. Hosp.*, 17: 271-278.

Meijkamp, B., Aerts, R., De Staaij, J., Tosserams, M., Ernst, H., Rozema, J. 1999. Effects of UV-B on secondary metabolites in plants. In: *Stratospheric ozone depletion: the effects of enhanced UV-B radiation on terrestrial ecosystems*. Rozema, J (ed). Backhuys Publishers, Leiden, The Netherlands pp.59-69.

Montenegro, G. 2002. Chile nuestra flora útil. Ediciones Universidad Católica de Chile.

Montes, M., Wilkomirsky, T., Valenzuela, L. 1992. Plantas medicinales. Ediciones Universidad de Concepción. 207 p.

Munné, S., Alegre, L. 2000. The significance of B-caroteno, α -tocopherol and the xanthophyll cycle in droughted *Melissa officinalis* plants. *Aust. J. Plant Physiol.* 27: 139-146.

Muñoz, Q. 1992. Química de la flora de Chile. Universidad de Chile. Dpto. técnico de investigación. Santiago, 351 p.

Muñoz, O., Montes, M., Wilkomirsky, T. 2000. Plantas medicinales de uso en Chile Química y Farmacología. Ediciones Univeridad de Chile. 330 p.

Nogués, S., Allen, J.D., Morison, I.L., Baker, R.N. 1998. Ultraviolet-B radiation effects on water relations, leaf development, and photoynthesis in droughted pea plants. *Plant physiol.* 177: 173-181.

Nogués, S., Allen, J.D., Morison, I.L., Baker, R.N. 1999. Caracterization of stomatal closure caused by ultraviolet-B radiation. *Plant physiol.* 121: 489-496.

Olsson, L.C., Weissenböck, G., Bornman, J.F. 1998. Differential flavonoids response to enhanced UV-B radiation in *Brassica napus*. *Phytochemistry*, 49 (4): 1021-1028.

Olsson, L.C., Veit, M., Bornman, J.F. 1999. Epidermal tranmittance and phenolic composition in leaves of atrazine tolerant and sensitive cultivars of *Brassica napus* grown under enhanced UV-B radiation. *Physiologia Plantarum* , 107:00-00 (In press).

Pinto, M., Lizana, C., Patenes, C. 2000. Efecto de la radiación ultravioleta-B sobre el crecimiento y la fotosíntesis de siete variedades de trigo (*Triticum aestivum* L.). *Rev. chil. hist. nat.* 73(1):55-66.

Puentes, P. 2004. Introducción a la Cromatografía de Líquidos de Alto Performance. Curso para Universidad Austral de Valdivia Instituto de Farmacia.

Quattrocchi, A., Andrizzi, A., Laba, F. 1992. Introducción a la HPLC: aplicación y práctica. Artes Gráficas Farro . Buenos Aires, 406 p.

Quevedo, R.M., Díaz, S.L. 2001 Crema epitelizante de clorofila, carotenos y vitaminas aplicada en heridas abiertas experimentales.. *Rev. Cubana Med Milit*, 30 (4): 236-240.

Ranking, S.M., De Whalley, C.V., Houltsjrs, y col. 1993. The modification of low density lipoprotein by the flavonoid myricetin and gossypetin. *Biochem pharmacol*, 45: 67-75.

Rozema, J., Staij, J., Björn, L., Nancy, D. 1999. Depletion of stratospheric ozone and solar UV-B radiation: evolution of land plants, UV-screens and function of polyphenolics. *Stratospheric ozone depletion: the effects of enhanced UV-B radiation on terrestrial ecosystems*. Rozema, J (ed). Backhuys Publishers, Leiden, The Netherlands pp.1-19.

Skoog, D.A., Leary, J.J. 2001. Análisis instrumental. McGraw-Hill. España, 935 p. 4ª edición.

Stryer, L., Berg, J., Tymoczko, J. 2002. Biochemistry. Freeman, NewYork, 974 p. 5ª edición.

Steubing, L., Godoy, E., Alberdi, M. 2002. Métodos de ecología vegetal. Editorial Universitaria, Santiago, 345 p.

Taiz, L., Zeiger, E. 2002. *Plant physiology*, Sinaver Associates, Inc., Publishers. Sunderland, Mass, 690 p. 3ª edición.

Tournaire, C., Croux, S., Maurette, M. 1993. Antioxidant activity of flavonoids: efficiency of singlet oxygen ($^1\text{-}\Delta\text{O}_2$) quenching. *Journal of Photochemistry and Photobiology*, 19:205-215.

Varas, P.D. 2004. Análisis de flavonoides en plantas medicinales del Sur de Chile con técnica HPLC. *Tesis de grado como parte de los requisitos para optar al Título de Químico Farmacéutico*. Facultad de Ciencias Universidad Austral de Chile. 59 p.

Villar, F.A. 1999. Farmacognosia general. Editorial síntesis. 293 p. 2ª edición.