



# Universidad Austral de Chile

Facultad de Ciencias  
Escuela de Química y Farmacia

**PROFESOR PATROCINANTE:** Dr. Alejandro Jerez M.  
**INSTITUTO :** Farmacia  
**FACULTAD :** Ciencias

## **“ANÁLISIS FITOQUÍMICO Y CUANTIFICACIÓN DE RUTINA EN EXTRACTOS METANÓLICOS DE *CORYNABUTILON VITIFOLIUM*”**

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

**IVONNE ANY CABRERA MOLINA**

VALDIVIA-CHILE

2016

## AGRADECIMIENTOS

Quiero agradecer al Instituto de Farmacia de la Universidad Austral de Chile, especialmente al profesor José Miguel Villatoro, quien me guió y aconsejó en gran parte de la tesis y al Dr. Alejandro Jerez por su gran disposición y amabilidad.

A la Dra. Karin Jürgens, quien siempre tuvo tiempo para atender mis consultas.

Al profesor Joel Pardo, quien trabajó conmigo en la parte experimental, ayudándome a sacar adelante la tesis.

A don Eduardo, por su simpatía, amabilidad y generosidad.

Agradezco a mi familia, especialmente a mis padres Ana y Roberto por todo el esfuerzo que han hecho, además de la confianza y el amor depositados en mí.

A Gabriel, por su fiel compañía, comprensión y paciencia incondicional que me ha entregado lo largo de todos estos lindos años.

Agradecer a mi compañera de carrera y amiga Daniela Neguiman por su ayuda desinteresada, consejos y amena compañía.

A mis amigos que pese a la distancia de alguna u otra forma ayudaron, Ceci y Rocco.

A todos los amigos y amigas que la vida ha puesto en mi camino.

Finalmente agradecer a Lupin y Tigrilla.

## CONTENIDO

<b>1. RESUMEN</b>	<b>10</b>
<b>1.1.3 SUMMARY</b>	<b>11</b>
<b>2. INTRODUCCIÓN</b>	<b>12</b>
<b>2.1 Familia Malvaceae</b>	<b>14</b>
2.1.1 <i>Corynabutilon vitifolium</i>	14
2.1.2 Uso de <i>Corynabutilon vitifolium</i> en la medicina mapuche	15
<b>2.2 Características generales de los flavonoides</b>	<b>16</b>
<b>2.3 Características estructurales y fisicoquímicas de rutina</b>	<b>16</b>
<b>2.4 Relevancia etnofarmacológica de rutina</b>	<b>17</b>
<b>3. HIPÓTESIS</b>	<b>19</b>
<b>4. OBJETIVOS</b>	<b>19</b>
<b>4.1 Objetivo general</b>	<b>19</b>
<b>4.2 Objetivos específicos:</b>	<b>19</b>
<b>5. MATERIALES Y MÉTODOS</b>	<b>20</b>
<b>5.1 Materiales:</b>	<b>20</b>
5.1.1 Material vegetal	20
5.1.2 Equipos	20
5.1.3 Reactivos	21
5.1.4 Material de laboratorio	21
5.1.5 Estándares	21
5.1.6 Desarrollo	21
<b>5.2 Metodología</b>	<b>22</b>
5.2.1. Recolección del material vegetal.	22
5.2.2. Extracción y preparación del material vegetal	23
5.2.3. Elaboración del extracto metanólico de <i>Corynabutilon vitifolium</i>	23
5.2.4. Determinación de fenoles totales	23
5.2.5. Determinación de flavonoides totales	24
5.2.6 Evaluación de la capacidad antioxidante del extracto metanólico en las hojas de <i>Corynabutilon vitifolium</i> a través del ensayo con el radical libre de DPPH	24
5.2.7. Identificación y cuantificación de rutina por medio de cromatografía en capa fina (CCF) y cromatografía líquida de alta eficiencia (HPLC)	25

<b>6. RESULTADOS</b>	<b>29</b>
<b>6.1. Determinación de fenoles totales en extractos metanólicos de <i>Corynabutilon vitifolium</i></b>	<b>29</b>
<b>6.2. Determinación de flavonoides totales en extractos metanólicos de <i>Corynabutilon vitifolium</i></b>	<b>30</b>
<b>6.3. Determinación de la capacidad antioxidante a través del ensayo con el radical libre de DPPH</b>	<b>32</b>
<b>6.4 Fingerprints e identificación de rutina en extracto metanólico de <i>Corynabutilon vitifolium</i> a través de técnicas cromatográficas</b>	<b>33</b>
6.4.1 Identificación de rutina en extracto metanólico de <i>Corynabutilon vitifolium</i> mediante cromatografía en capa fina (CCF)	33
6.4.2 Fingerprints e identificación de rutina en extracto metanólico de <i>Corynabutilon vitifolium</i> a través de RP-HPLC acoplado a detector UV-visible	35
6.4.3 Fingerprints e identificación de rutina en extracto metanólico de <i>Corynabutilon vitifolium</i> a través de RP-HPLC acoplado a detector con arreglo de diodos (DAD)	38
6.4.4 Cuantificación de rutina en extracto metanólico de hojas de <i>Corynabutilon vitifolium</i> a través de RP-HPLC acoplado a un detector con arreglo de diodos (DAD)	41
<b>7. DISCUSIÓN</b>	<b>45</b>
<b>8. CONCLUSIONES</b>	<b>50</b>
<b>9. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b>	<b>51</b>
<b>10. ANEXOS</b>	<b>59</b>

## ÍNDICE DE FIGURAS

- Figura 1.** Hojas de *Corynabutilon vitifolium* . Fotografía obtenida a través de la página web: chileflora.com 14
- Figura 2.** Flor blanca de *Corynabutilon vitifolium*. Fotografía obtenida a través de la página web: <http://jardinbotanicouach.cl> 15
- Figura 3.** Estructura básica de los flavonoides y enumeración del esqueleto hidrocarbonado. 16
- Figura 4.** Estructura molecular de rutina 17
- Figura 5.** Imagen de la zona de recolección de la especie *Corynabutilon vitifolium*. 22
- Figura 6.** Muestras: A (Muestra metanólica *Corynabutilon vitifolium* 100 mg/mL), B (*Pool* de flavonoides) y C (rutina 360 µg/mL) sembradas en placas de silica gel leídas a diferentes longitudes de onda: placa 1: 254 nm, placa 2: 302 nm y placa 3: 365 nm. 34
- Figura 7.** Cromatograma obtenido a partir del extracto metanólico de hojas de *Corynabutilon vitifolium* 10 mg/mL diluido en agua HPLC. Volumen de inyección 20 µL. Canal de absorbancia 255 nm. Tiempo de corrida 37 minutos. 36
- Figura 8.** Cromatograma estándar de rutina (36 µg/mL) preparado con agua HPLC. Volumen de inyección 20 µl. Canal de absorbancia: 255 nm. Tiempo de elución 37 minutos. 37
- Figura 9.** Cromatograma *pool* de flavonoides: rutina (30 µg/mL), quercetina (82 µg/mL), crisina (22 µg/mL), kamferol (33 µg/mL) y galangina (18 µg/mL), ordenados según aparición en cromatograma. *Pool* preparado con agua HPLC. Volumen de inyección 20 µL. Canal de absorbancia: 255 nm. Tiempo de elución 37 minutos. 38
- Figura 10.** Cromatograma extracto metanólico *Corynabutilon vitifolium* (10 mg/mL) preparado con agua HPLC. Volumen de inyección 20 µL. Canal de absorbancia: 255 nm. Tiempo de elución 37 minutos. 39

**Figura 11.** Barrido espectral del pico máximo (flavonoide rutina): Muestra metanólica *Corynabutilon vitifolium*, longitud de onda máxima: 256 y 354 nm. Volumen de inyección 20 µL. 39

**Figura 12.** Cromatograma extracto metanólico *Corynabutilon vitifolium* coinyección flavonoide rutina (180 µg/mL) preparado con agua HPLC. Volumen de inyección 20 µL. Canal de absorbancia: 255 nm. Tiempo de elución 37 minutos. 40

**Figura 13.** Barrido espectral del pico máximo (flavonoide rutina): Coinyección estándar de rutina (180 µg/mL), longitud de onda máxima : 255 y 354 nm. Volumen de inyección 20 µL. 41

**Figura 14.** Cromatograma obtenido a través de la elución triplicado (anexo) del extracto metanólico de *Corynabutilon vitifolium* mediante el empleo de HPLC acoplado a detector con arreglo de diodos (DAD). Volumen de inyección 20 µL. Canal de absorbancia 255 nm. Tiempo de elución 37 minutos. 43

## ÍNDICE DE TABLAS

- Tabla 1.** Fase móvil utilizada para el análisis cualitativo del extracto metanólico de hojas de *Corynabutilon vitifolium* mediante cromatografía en capa fina (CCF). 26
- Tabla 2.** Fase móvil empleada para eluir la muestra de extracto metanólico de hojas de *Corynabutilon vitifolium* por medio del HPLC-UV y HPLC-DAD, utilizando un sistema de gradiente. 27
- Tabla 3.** Concentraciones expresadas en  $\mu\text{g/mL}$ , obtenidas a partir del extracto metanólico de *Corynabutilon vitifolium* (5 mg/mL) realizado por triplicado mediante el método colorimétrico Folin-Ciocalteu para la cuantificación de fenoles totales. 30
- Tabla 4.** Concentraciones expresadas en  $\mu\text{g/mL}$ , obtenidas a partir del extracto metanólico de *Corynabutilon vitifolium* (10 mg/mL) realizados por triplicado mediante el método colorimétrico cloruro de aluminio para la cuantificación de flavonoides totales. 31
- Tabla 5.** Porcentaje de inhibición del radical libre de DPPH por los estándares de Trolox<sup>®</sup> a diferentes concentraciones (50, 200 y 500  $\mu\text{g/mL}$ ). 32
- Tabla 6.** Porcentajes de inhibición del radical libre de DPPH, obtenidas a partir del extracto metanólico de *Corynabutilon vitifolium* (10 mg/mL) realizado por triplicado. 33
- Tabla 7.** Resultados de los  $R_f$  calculados para las muestras A (Muestra metanólica de hojas de *Corynabutilon vitifolium* 100 mg/mL), B (*Pool* de flavonoides: galangina (178  $\mu\text{g/mL}$ ), kamferol (333  $\mu\text{g/mL}$ ), crisina (215  $\mu\text{g/mL}$ ), quercetina (823  $\mu\text{g/mL}$ ) y rutina (301  $\mu\text{g/mL}$ )) y C (rutina 360  $\mu\text{g/mL}$ ) sembradas en sílica gel. 35
- Tabla 8.** Tiempo de retención, área, altura, concentración, promedio, desviación estándar y coeficiente de variación de los extractos metanólicos de hojas de *Corynabutilon vitifolium* adquiridos por medio de HPLC-DAD. 43

## ÍNDICE DE GRÁFICOS

**Gráfico 1.** Curva de calibración obtenida a través del método colorimétrico Folin-Ciocalteu utilizando ácido gálico como estándar a concentraciones de 10, 20, 30, 40 y 50  $\mu\text{g/mL}$ , donde cada punto obtuvo un porcentaje de coeficiente de variación diferente. Se grafica absorbancia versus concentración de ácido gálico ( $\mu\text{g/mL}$ ). 29

**Gráfico 2.** Curva de calibración obtenida a través del método colorimétrico cloruro de aluminio, utilizando quercetina como estándar a concentraciones de 2, 4, 6, 8 y 10  $\mu\text{g/mL}$ , donde cada punto obtuvo un porcentaje de coeficiente de variación diferente. Se grafica absorbancia versus concentración de quercetina ( $\mu\text{g/mL}$ ). 31

**Gráfico 3.** Curva de calibración con estándar rutina, a concentraciones de: 10, 25, 50, 100, 150 y 250  $\mu\text{g/mL}$  versus área de los picos (mAUx min). 42

## GLOSARIO DE ABREVIATURAS

<b>Log P</b>	: Coeficiente de reparto.
<b>pka</b>	: Constante de disociación ácida.
<b>RP-HPLC</b>	: Cromatografía líquida de alta eficiencia por fase reversa.
<b>CCF</b>	: Cromatografía en capa fina.
<b>DPPH</b>	: Radical 2,2-difenil-1-picrilhidrazilo.
<b>TFA</b>	: Ácido trifluoroacético.
<b>DE</b>	: Desviación Estándar.
<b>CV</b>	: Coeficiente de Variación.
<b>Rf</b>	: Factor de retención.
<b>Tr</b>	: Tiempo retención.
<b>AU</b>	: Unidades de absorbancia.
<b>EQ</b>	: Equivalente de quercetina.
<b>EC</b>	: Equivalente de catequina.
<b>EAG</b>	: Equivalente de ácido gálico.
<b>PTFE</b>	: Politetrafluoroetileno

## 1. RESUMEN

*Corynabutilon vitifolium* es una especie endémica de nuestro país perteneciente a la familia Malvaceae, empleada por la medicina tradicional mapuche para producir contracciones uterinas, además de poseer propiedades emolientes, antigastrálgicas y antirreumáticas.

Para el presente estudio se preparó un extracto metanólico a partir de hojas secas y pulverizadas de *Corynabutilon vitifolium*, las que fueron recolectadas en Pilolcura, Región de los Ríos, Chile. Se determinaron fenoles y flavonoides totales, además se evaluó la actividad antioxidante por medio del radical libre DPPH. El flavonoide rutina presente en el extracto metanólico se identificó y cuantificó a través de RP-HPLC UV-Vis y detección DAD, respectivamente.

El contenido de fenoles totales (291,3 mg EAG/g de peso seco) y flavonoides totales ( $68,0 \pm 0,437$  mg EQ/g de peso seco) en el extracto metanólico fue comparada con la cantidades descrita en bibliografía para *Peumus boldus* (23,0 mg EAG/g de peso seco) y *Ruta chalepensis* ( $8,23 \pm 0,31$  mg EC/g de peso seco), respectivamente, siendo *Corynabutilon vitifolium* superior en ambos casos. Mientras que la capacidad antioxidante de los extractos metanólicos de *Corynabutilon vitifolium* (10 mg/mL) fue comparada con la investigación realizada por Yen sobre los extractos acuosos de *Camellia sinensis* (50 mg/mL). Se obtuvieron porcentajes de inhibición similares, 53,6% para *C. vitifolium* y 59,4 % para *C. sinensis*.

En el extracto metanólico de *Corynabutilon vitifolium* se identificó rutina y se cuantificó por medio del RP-HPLC-DAD. El contenido de rutina en *Corynabutilon vitifolium* ( $29,282 \pm 0,858$  µg/mL) fue considerablemente inferior a lo descrito en bibliografía para *Ruta graveolens* ( $237,0 \pm 0,3$  µg/mL). Por lo tanto, para alcanzar concentraciones de rutina similares a los productos farmacéuticos comercializados se necesitarían 170,8 g de hojas desecadas y pulverizadas preparadas como extracto metanólico.

### 1.3 Summary

*Corynabutilon vitifolium* is an endemic species from our country that belongs to Malvaceae family, used by the traditional “*mapuche*” medicine to produce cervix contractions, moreover the infusion is emollient, it produces stomach reliefs and it is antirheumatic.

To the current study it was prepared a methanolic extract from dry and pulverised leaves from *Corynabutilon vitifolium*, which were recollected in “Pilolcura, Región de los Ríos, Chile”. There were determined total phenols and flavonoids, just like also the antioxidant activity through the free radical DPPH. The flavonoid rutin present in the methanolic extract were identified and quantified by the RP-HPLC UV-Vis and HPLC-DAD, respectively.

The total phenols content (291,3 mg. EAG/g of dry weight) and total flavonoids ( $68,0 \pm 0,437$  mg. EQ/g of dry weight) in the methanolic extract were compared with the quantity described in the bibliography to *Peumus boldus* (23,0 mg EAG/g of dry weight) and *Ruta chalepensis* ( $8,23 \pm 0,31$  mg. EC/g of dry weight), respectively, being *Corynabutilon vitifolium* superior in both cases. While the antioxidant capacity of the methanolic extracts of *Corynabutilon vitifolium* (10 mg/mL) was compared with aqueous extracts of *Camellia sinensis* (50 mg/mL), species investigated by Yen in 1995. Similar percentages of inhibition were obtained, 53.6% for the *C. vitifolium* and 59.4% for the *C. sinensis*.

In the methanolic extract of *Corynabutilon vitifolium* it was identified rutin and it was quantified by the RP-HPLC-DAD. The rutin content in *Corynabutilon vitifolium* ( $29,282 \pm 0,858$   $\mu\text{g/mL}$ ) it was considerably lower than the described in the bibliography to *Ruta graveolens* ( $237,0 \pm 0,3$   $\mu\text{g/mL}$ ). therefore, to achieve concentrations similar of rutin to those marketed pharmaceuticals needed 170.8 g of dried and pulverized leaves prepared as methanolic extract.

## 2. INTRODUCCIÓN

Chile es un país ubicado al sudoeste de América del sur, cuya frontera se encuentra delimitada por cuatro grandes barreras naturales (océano Pacífico, Antártica chilena, desierto de Atacama y cordillera de los Andes) (1) que impiden el intercambio genético entre especies vegetales existentes al interior del territorio con aquellas presentes en otras regiones (2). Este aislamiento geográfico, sumado a los climas extremos, generan que la flora endémica sea superior al 45% (3).

Según el censo realizado el año 2012, Chile posee una población total de 16.634.603 personas, donde el 11,11 % (1.714.677 personas) dice pertenecer a uno de los nueve pueblos originarios reconocidos por la ley N° 19.253. Del total de la población aborigen, el 84,11% declaró ser mapuche, lo que permite establecer que ésta es la etnia más numerosa del país (4).

Los mapuches (*mapu*=Tierra y *che*=persona, en su idioma, el *mapudungun*) o araucanos (denominación dada por los españoles), corresponden a uno de los pueblos aborígenes más numerosos de América, quienes descendieron desde Centroamérica llegando a lo que hoy en día es territorio chileno, asentándose desde el valle Aconcagua hasta la isla grande de Chiloé (5,6). Además, hubo un pequeño grupo que se ubicó en la provincia de Neuquén, Argentina (7).

La conquista española provocó que se fusionara la cultura hispana con la mapuche, formando un grupo heterogéneo de personas que, hasta el siglo XIX, se dedicaban mayoritariamente a la agricultura y ganadería, prácticas que se vieron debilitadas con la pacificación de la Araucanía que dividió en pequeñas porciones el territorio (8). Pese a los cambios sufridos en el tiempo, el pueblo mapuche atesoró y resguardó su cultura y costumbres ancestrales (9).

En la actualidad, la comunidad mapuche habita principalmente al sur del país, concentrándose en las zonas rurales. Muchas veces, el aislamiento geográfico y la falta de recursos, provoca que el acceso a los sistemas de salud sea nulo o escaso (10). Este pueblo aborigen posee la medicina tradicional que nace a partir del conocimiento de las propiedades inherentes de la planta y la cosmovisión que los mapuches poseen del mundo (11), lo que se traduce en el cultivo y utilización de numerosas especies vegetales para curar las dolencias (12).

Los mapuches suelen clasificar la enfermedad en diferentes tópicos dependiendo de: la gravedad, cronicidad, etiología (si es producida por un ente maligno, persona o personalidad),

origen (si el padecimiento es de origen mapuche o externo) y, por último, dependiendo de quién sea el afectado (*machi* o individuo de la comunidad) (13). Sin embargo, a pesar de la categorización de la enfermedad, se ha documentado que mayoritariamente utilizan las plantas medicinales para provocar efectos antiinflamatorios, antipiréticos y analgésicos (14). Para que la especie vegetal pueda causar los efectos nombrados anteriormente, esta debe ser preparada como infuso, decocto, extracto, tintura, elixir y, en algunos casos, se pueden masticar partes de la planta (15). A pesar de la gran variedad de preparaciones, los pueblos originarios prefieren realizar infusiones (52%) o decocciones (22%) (16). La infusión se obtiene al vaciar agua caliente sobre el material vegetal (flores, hojas, frutos), dejándose reposar por algunos minutos. En contraste, la decocción consiste en hervir el material vegetal, extrayendo un mayor número de sustancias y aromas que en la infusión (17).

Las preparaciones anteriormente nombradas favorecen la extracción de múltiples compuestos beneficiosos como vitaminas, antocianinas, carotenoides y flavonoides (18). En este último grupo precisamente se ha concentrado la atención de la comunidad científica, dado que los flavonoides son empleados en múltiples ocasiones como potentes antioxidantes, pues tienen en su estructura una cantidad variable de grupos hidroxilos fenólicos que donan hidrógeno y, de esta manera, previenen o evitan la oxidación de otras moléculas como lípidos, carbohidratos, proteínas, etc. (19). Su déficit o escasa ingesta se correlaciona con enfermedades como cáncer, diabetes mellitus tipo II y trastornos cardiovasculares, padecimientos que en la actualidad representan un gran número de muertes a nivel mundial (20,21).

Pese al gran interés que despiertan los compuestos polifenólicos presentes en el reino vegetal, existe una gran cantidad de especies endémicas que escasamente han sido investigadas, desconociéndose por completo su información química y actividad biológica. Por ejemplo sólo se han podido encontrar dos estudios relacionados a *Corynabutilon vitifolium*, el primero realizado en 1984 por Reyes & Vega y el segundo en el año 2011 por Mølgaard *et al.* La información aportada en estas dos investigaciones ayuda a la caracterización de la especie, sin embargo, aún hay aspectos relevantes que deberían ser estudiados como la actividad biológica, toxicidad y farmacocinética, para que eventualmente se pueda validar el uso de *Corynabutilon vitifolium* y otras especies endémicas en la medicina tradicional.

## 2.1 Familia Malvaceae

Actualmente la familia Malvaceae posee alrededor 250 géneros y más de 4.000 especies que se encuentran presentes en todo el mundo, aunque la mayoría se ubica en la región sur de América (22,23). Tal es el caso del género *Corynabutilon* que posee 7 especies (*C. bicolor*, *C. ceratocarpum*, *C. hirsutum*, *C. ochsenii*, *C. salicifolium*, *C. viride* y *C. vitifolium*) (24) distribuidas entre Chile y Argentina (25).

### 2.1.1 *Corynabutilon vitifolium*

*Corynabutilon vitifolium* es un arbusto endémico de Chile conocido popularmente como “Huella”. Este crece preferentemente en las quebradas y puede llegar a medir hasta 3 metros de altura (26). Su tallo es simple, ya que se encuentra poco ramificado (27). Sus hojas son grandes (pueden alcanzar hasta 10 cm de diámetro) y lobuladas, dándole la apariencia de ser una hoja de parra (figura 1), además, presentan en su cara posterior vello ceniciento (28). Las flores son grandes y blancas, encontrándose solas o agrupadas en racimos (figura 2). El fruto se presenta como una cápsula redonda y velluda que aparece en verano (26,27).



**Figura 1.** Hojas de *Corynabutilon vitifolium* . Fotografía obtenida a través de la página web: [chileflora.com](http://chileflora.com)



**Figura 2.** Flor blanca de *Corynabutilon vitifolium*. Fotografía obtenida a través de la página web: <http://jardinbotanicouach.cl>

### **2.1.2 Uso de *Corynabutilon vitifolium* en la medicina mapuche**

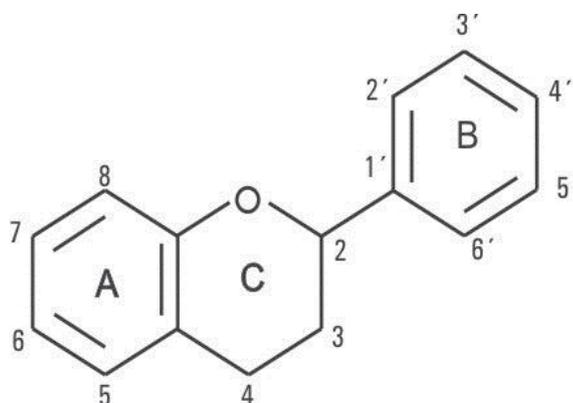
Las partes utilizadas son el tallo y la corteza que se preparan como decocto y las hojas como infuso, siendo estas últimas las más usadas (14). Ambas preparaciones se utilizan para facilitar partos complicados gracias a que provocan fuertes contracciones uterinas (27) y también se emplean para tratar enfermedades al hígado (14). Los infusos y decoctos son, además, emolientes, antirreumáticos y antigastrálgicos (28).

En esta investigación sólo fue posible encontrar dos estudios relacionados a *Corynabutilon vitifolium*, el primero de ellos data del año 1984 donde se aislaron algunos flavonoides glicosilados y al estado libre. Dentro de estos últimos se describen quercetina, quercetina-3-D-galactósido, kamferol, rutina y ramnetina (28). El segundo estudio fue realizado en el año 2011 y evaluó la actividad antimicrobiana en hojas y tallos, determinando que *Corynabutilon vitifolium* no presenta actividad bactericida y/o bacteriostática frente a *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis*, *Candida albicans* y *Penicillium expansum* (14).

## 2.2 Características generales de los flavonoides

Los flavonoides son pigmentos (29) no nitrogenados de bajo peso molecular distribuidos ampliamente en el reino vegetal. Una de sus principales funciones es proteger a estos organismos del deterioro producido por los rayos ultravioleta, depredadores y sustancias oxidantes, entre otras. En la naturaleza, se encuentran en su estado metilado o glicosilado, ya que esto les brinda mayor estabilidad (30).

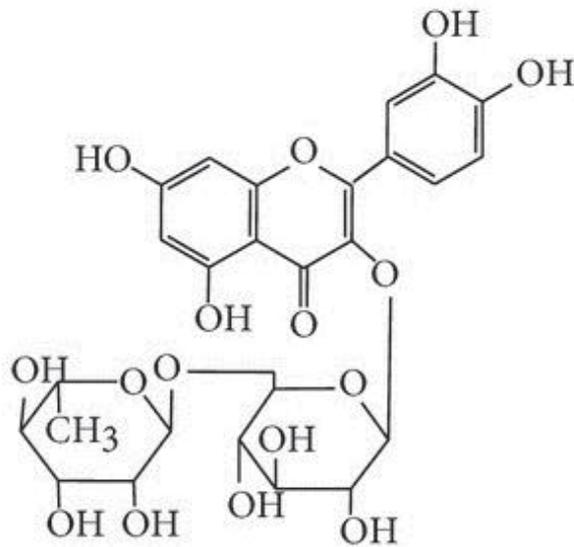
Todos los flavonoides presentan 15 átomos de carbono que componen su núcleo básico (2-fenilbenzopirona). En la figura 3 se observa que la estructura presenta dos anillos aromáticos (A y B) unidos a través de tres unidades de carbono por un anillo heterocíclico (C) (31).



**Figura 3.** Estructura básica de los flavonoides y enumeración del esqueleto hidrocarbonado.

## 2.3 Características estructurales y fisicoquímicas de rutina

La rutina ( $C_{27}H_{30}O_{16}$ ) (figura 4) es un flavonol también conocido como quercetina-3 rutinósido, rutósido o fitomelin (32). Pertenece a la sub clase de flavonoide glicosilado (33), pues se origina a partir de la unión entre quercetina y el disacárido rutinosa (ramnosa unida a glucosa mediante un enlace glicosídico  $1\beta\rightarrow6$ ) (34), alcanzando un peso molecular de 610,52 Da (32).



**Figura 4.** Estructura molecular de rutina.

Dentro de las características fisicoquímicas destaca la solubilidad en agua (125 mg/mL) que está dada por su coeficiente de reparto (Log P): 0.15 (33); sin embargo, la presencia de un disacárido hace que la molécula sea más hidrofílica que aquellas con un monosacárido en estructura como tilirosida (35). Otra de las propiedades fisicoquímicas del flavonoide rutina es ser un ácido débil cuyo  $pK_a$  es aproximadamente de 4,3, cuando el grupo 3'-OH en el anillo B esta desprotonado (36).

#### 2.4 Relevancia etnofarmacológica de rutina

La rutina es un flavonoide consumido en la medicina tradicional que, administrado a través de brebajes (decoctos, infusos o zumos) y alimentos de origen vegetal (37), puede causar un potente efecto antioxidante (38), antiinflamatorio y anticancerígeno (39). Además, en los últimos años gracias a los estudios *in vivo* e *in vitro* se ha demostrado que el flavonoide rutina actúa en diferentes sistemas, tales como: sistema nervioso central (efecto sedante, antidepresivo y anticonvulsivante), sistema cardiovascular (efecto antiagregante plaquetario, anticoagulante y antihipertensivo), sistema endocrino (efecto hipoglucemiante e hipocolesterolémico), sistema respiratorio (antiasmático) y sistema excretor (efecto diurético) (40).

Además, debido a los grandes beneficios que trae sobre el sistema circulatorio gracias a la capacidad que posee de disminuir la permeabilidad y aumentar la resistencia capilar, este

flavonoide ha despertado gran interés en la industria farmacéutica que, desde hace algunos años, ha aislado rutina a partir de numerosas especies vegetales para obtener preparados farmacéuticos como cápsulas y comprimidos (41).

### 3. HIPÓTESIS:

Es posible identificar y cuantificar el flavonoide rutina en los extractos metanólicos de *Corynabutilon vitifolium* obtenidos a partir de las hojas desecadas y pulverizadas.

### 4. OBJETIVOS:

#### 4.1 Objetivo general

Cuantificar el contenido de rutina mediante técnica de RP-HPLC y evaluar la capacidad antioxidante de los extractos metanólicos de las hojas desecadas y pulverizadas de *Corynabutilon vitifolium*.

#### 4.2 Objetivos específicos:

- Recolectar el material vegetal durante la época estival en la zona costera de la Región de los Ríos.
- Obtener extractos metanólicos de las hojas desecadas y pulverizadas de *Corynabutilon vitifolium*.
- Cuantificar fenoles totales en extractos metanólicos obtenidos a partir de las hojas desecadas y pulverizadas de *Corynabutilon vitifolium*.
- Cuantificar flavonoides totales en extractos metanólicos obtenidos a partir de las hojas desecadas y pulverizadas de *Corynabutilon vitifolium*.
- Evaluar la capacidad antioxidante de los extractos metanólicos obtenidos a partir de las hojas desecadas y pulverizadas de *Corynabutilon vitifolium*, a través del ensayo de DPPH.
- Verificar presencia del flavonoide rutina, a partir de los extractos metanólicos de las hojas desecadas y pulverizadas de *Corynabutilon vitifolium*, a través de cromatografía en capa fina (CCF).
- Obtener, a partir de los extractos metanólicos de las hojas desecadas y pulverizadas de *Corynabutilon vitifolium*, los *fingerprints* a través de la técnica RP-HPLC.
- Identificar y cuantificar, mediante técnica de RP-HPLC, la rutina presente en los extractos metanólicos preparados a partir de las hojas desecadas y pulverizadas de *Corynabutilon vitifolium*.

## 5. MATERIALES Y MÉTODOS

### 5.1 Materiales:

#### 5.1.1 Material vegetal

- Hojas desecadas de *Corynabutilon vitifolium*.

#### 5.1.2 Equipos

- Balanza gravimétrica marca GP modelo No. NX410
- Baño de ultrasonido. BRANDASONIC, modelo 8510E-DTH.
- Desionizador Elga classic UVMK2.
- Estufa, BINDER serie FED.
- HPLC-DAD Shimadzu modelo Prominence.
  - Autosampler modelo SIL-20A.
  - Bomba Cuaternaria modelo LC-20AT.
  - Controlador de sistema CBM-20A.
  - Desgasificador modelo DGU-20A5 .
  - Detector de arreglo de diodos SPD-M20A.
  - Horno CTO-20AC.
  - Software LC Solutions.
- HPLC-UV Shimadzu modelo Prominence
  - Bomba cuaternaria modelo LC-20AT.
  - Controlador de sistema modelo CBM-20A.
  - Desgasificador DGU-20A5.
  - Detector UV-Visible modelo SPD-20AV.
  - Horno modelo CTO- 20AC
  - Software LC Solutions.
- Espectrofotómetro UV- visible Thermo Scientific. Modelo Helios  $\alpha$ .
- Lámpara UV-visible
- Picadora Sindelen modelo P-123.
- Vórtex marca Wids VM-10.

### 5.1.3 Reactivos

- 2,2- difenil-1-picrilhidrazilo (DPPH) Sigma Chemical<sup>®</sup>.
- Acetato de etilo Merck<sup>®</sup>.
- Ácido acético glacial Merck<sup>®</sup>.
- Ácido fórmico Merck<sup>®</sup>.
- Agua desionizada.
- Tricloruro de aluminio, AlCl<sub>3</sub>.
- Metanol grado HPLC Merck<sup>®</sup>.
- Carbonato de sodio, Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> Merck<sup>®</sup>.
- Nitrito de sodio, NaNO<sub>2</sub> Merck<sup>®</sup>.
- Reactivo de fenol de Folin- Ciocalteu Merck<sup>®</sup>.

### 5.1.4 Material de laboratorio

- Mechero Bunsen.
- Material fungible.
- Columna C-18 VP-ODS 250 L x 4,6 mm de diámetro, tamaño de partícula 5 µm.

### 5.1.5 Estándares

- Ácido gálico p.a Merck<sup>®</sup>.
- Flavonoide crisina (≥ 98%) Sigma- Aldrich<sup>®</sup>.
- Flavonoide galangina Sigma- Aldrich<sup>®</sup>.
- Flavonoide kamferol (≥99.0%) Sigma- Aldrich<sup>®</sup>.
- Flavonoide quercetina (≥95%) Sigma- Aldrich<sup>®</sup>.
- Flavonoide rutina (≥94%) Sigma- Aldrich<sup>®</sup>.
- Trolox<sup>®</sup> (98,1%) Calbiochem<sup>®</sup>.

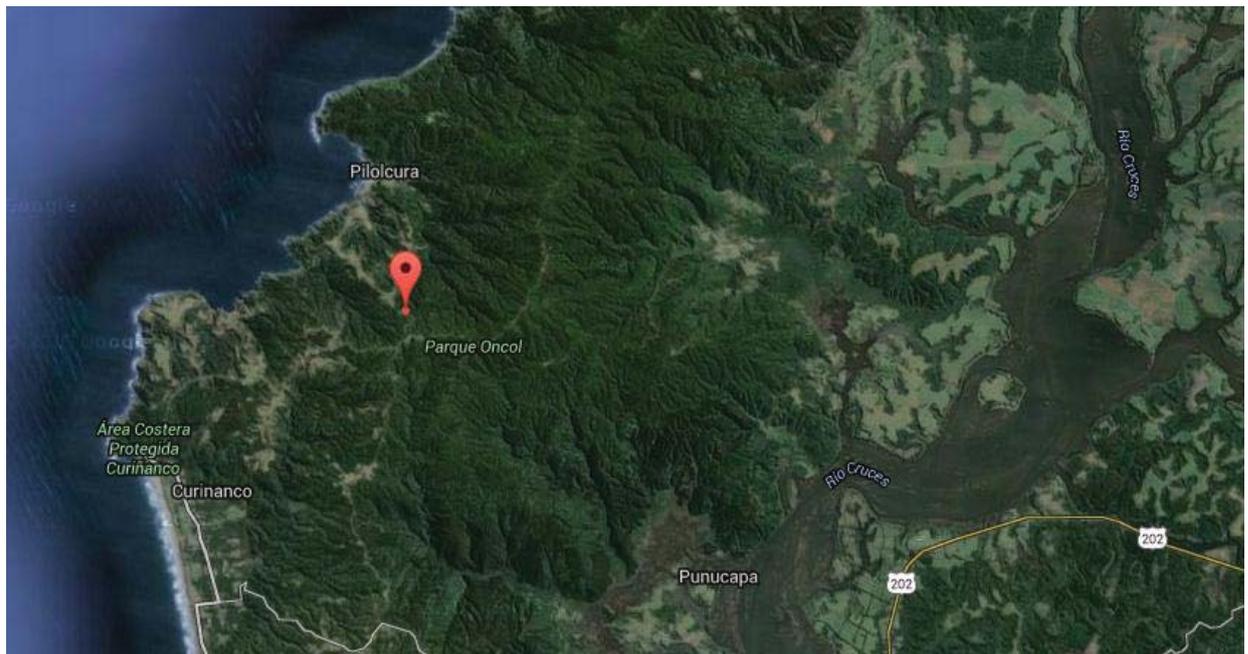
### 5.1.6 Desarrollo

- Laboratorios del Instituto de Farmacia, Universidad Austral de Chile, Valdivia.

## 5.2 Metodología

### 5.2.1. Recolección del material vegetal.

La recolección del material vegetal fue realizada el día 4 de enero del año 2016 en el sector de Pilolcura (coordenadas: 39°41'37.0"S 73°20'30.6"W) (figura 5), comuna de Valdivia, Región de los Ríos, Chile.



**Figura 5.** Imagen de la zona de recolección de la especie *Corynabutilon vitifolium*.

### **5.2.2. Extracción y preparación del material vegetal**

El secado de las hojas de *Corynabutilon vitifolium* fue realizado en dos pasos. En un comienzo las hojas se secaron sobre papel periódico a temperatura ambiente durante una semana. Posteriormente, para completar la desecación, las hojas fueron llevadas a una estufa a temperatura promedio de 44°C por 23 horas. Por último, las hojas secas fueron pulverizadas en una picadora y almacenadas en una bolsa protegida de la luz y la humedad.

### **5.2.3. Elaboración del extracto metanólico de *Corynabutilon vitifolium***

A 100 g de hojas pulverizadas de *Corynabutilon vitifolium* se le agregó 1L de metanol, dejándose macerar durante 48 horas (primera maceración) a temperatura ambiente (22°C). Después de haber concluido el tiempo se filtró con papel filtro cualitativo circular 125 mm, lo que permitió obtener un extracto metanólico y un residuo de hojas. Este residuo fue macerado (segunda maceración) y tratado en las mismas condiciones que anteriormente se describen, consiguiendo un segundo extracto metanólico. Luego, el residuo fue eliminado y los extractos metanólicos obtenidos a partir de la primera y segunda maceración se juntaron. Finalmente el extracto metanólico se almacenó en un ambiente refrigerado y protegido de la luz.

### **5.2.4. Determinación de fenoles totales**

El contenido de fenoles totales en el extracto metanólico de las hojas de *Corynabutilon vitifolium* se determinó por medio del método colorimétrico Folin-Ciocalteu propuesto por Singleton (42) modificado.

Para la elaboración de la curva de calibración se utilizó un estándar de ácido gálico a concentraciones de 10, 20, 30, 40 y 50 µg/mL que fueron preparadas con metanol. Adicionalmente se preparó un blanco con agua destilada.

Para que se produzca la reacción colorimétrica se tomaron 500 µL del extracto metanólico al que se le adicionaron 2500 µL del reactivo Folin- Ciocalteu, se agitó por 1 minuto y se dejó reposar por 5 minutos. Posteriormente, se añadieron 2000 µL de carbonato de sodio

(Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>) al 7,5% y se incubó a temperatura ambiente (22°C), protegido de la luz. Luego, se llevó a lectura en el espectrofotómetro a una longitud de onda de 740 nm. Finalmente, los resultados fueron expresados como miligramos (mg) equivalentes de ácido gálico por gramo (g) de material seco.

### **5.2.5. Determinación de flavonoides totales**

El contenido de flavonoides totales en el extracto metanólico de hojas de *Corynabutilon vitifolium* se determinó por medio del método colorimétrico cloruro de aluminio propuesto por Jagadish (43) modificado.

Para la elaboración de la curva de calibración se utilizó un estándar de quercetina a concentraciones de 10, 20, 30, 40 y 50 µg/mL, que fueron preparadas con metanol. Adicionalmente, se preparó un blanco con agua destilada.

Para que se produzca la reacción colorimétrica se tomó un matraz aforado de 10 mL y se le adicionaron 1000 µL de muestra metanólica, 4000 µL de agua destilada y 300 µL de nitrito de sodio NaNO<sub>2</sub> (aq) al 10%. Se mezcló y se dejó reposar por 5 minutos; una vez transcurrido este tiempo, se le agregaron 300 µL tricloruro de aluminio (AlCl<sub>3</sub> aq) al 10%. Luego al minuto 6 se añadieron 2000 µL de NaOH 1M y se completó el volumen con agua destilada. Posteriormente, se llevó a lectura en el espectrofotómetro a una longitud de onda de 510 nm. Finalmente, el contenido total de flavonoides se expresó como miligramos (mg) equivalentes de quercetina por gramo (g) de peso seco.

### **5.2.6 Evaluación de la capacidad antioxidante del extracto metanólico en las hojas de *Corynabutilon vitifolium* a través del ensayo con el radical libre de DPPH**

La actividad experimental para evaluar la capacidad antioxidante fue la utilización del radical libre 2,2- difenil-1-picrilhidrazilo (DPPH), que se preparó a una concentración de 0,1 mM en metanol, de acuerdo a lo propuesto por Kara (44). Los extractos metanólicos se elaboraron a una concentración de 10 mg/mL.

Para poder efectuar la reacción colorimétrica se tomaron 750  $\mu\text{L}$  de extracto metanólico y 2250  $\mu\text{L}$  de DPPH, la solución se mezcló por 10 segundos y se llevó a lectura en el espectrofotómetro a de 517 nm. Además se preparó un blanco con agua destilada y el radical libre DPPH que fue medido a la misma longitud de onda (44).

Con el propósito de tener un estimado de la capacidad antioxidante de los extractos metanólicos, se realizó una solución patrón con el estándar Trolox<sup>®</sup> preparado en metanol para obtener los controles positivos a concentraciones de 50, 250 y 500  $\mu\text{g/mL}$ , donde cada uno se analizó por triplicado.

Una vez obtenidas las absorbancias de los controles positivos (triplicado), extracto metanólico (triplicado) y el blanco, se procedió a calcular el porcentaje de inhibición de cada triplicado, por medio de la siguiente fórmula:

$$\% \text{ inhibición} = \left[ 1 - \left( \frac{\text{Absorbancia de la muestra}}{\text{Absorbancia del blanco}} \right) \right] \times 100$$

## **5.2.7. Identificación y cuantificación de rutina por medio de cromatografía en capa fina (CCF) y cromatografía líquida de alta eficiencia (HPLC)**

### **5.2.7.1 Identificación de rutina por cromatografía en capa fina (CCF)**

La fase estacionaria utilizada fue una placa de sílica gel que fue cortada en 10x4 cm. A un centímetro de la base se trazó una delgada línea en sentido horizontal con lápiz grafito, empleada posteriormente para sembrar las muestras con separación de 1 cm. La distancia de recorrido total fue de 8 cm.

La fase móvil se compuso de acetato de etilo, ácido acético glacial, ácido fórmico y agua, esta última fue agregada gradualmente a la mezcla (45) hasta completar un volumen de 20 mL. El detalle de la composición de fase móvil se detalla en la tabla 1.

**Tabla 1.** Fase móvil utilizada para el análisis cualitativo del extracto metanólico de hojas de *Corynabutilon vitifolium* mediante cromatografía en capa fina (CCF).

<b>Solvente</b>	<b>Volumen (mL)</b>
Acetato de etilo	13,4
Ácido fórmico	1,5
Ácido acético glacial	1,5
Agua	3,6
Total	20

Para el análisis cualitativo se ocupó un estándar de rutina (360  $\mu\text{g/mL}$ ) y un *pool* de flavonoides que contenía galangina (178  $\mu\text{g/mL}$ ), kamferol (333  $\mu\text{g/mL}$ ), crisina (215  $\mu\text{g/mL}$ ), quercetina (823  $\mu\text{g/mL}$ ) y rutina (301  $\mu\text{g/mL}$ ). Las muestras fueron sembradas en la placa sobre la línea base trazada con antelación, llevándola a la cámara que contenía la fase móvil. Luego de que la fase móvil recorriera los 8 centímetros de distancia, la placa se retiró y se secó. Por último, la lámina de sílica de gel se reveló a tres longitudes de onda: 254, 302 y 365 nm.

#### **5.2.7.2 Identificación de rutina por cromatografía líquida de alta eficiencia por fase reversa (RP-HPLC) acoplada a un detector UV- Visible (HPLC UV-Vis) y por cromatografía líquida de alta eficiencia acoplada a un detector de arreglo de diodo (HPLC- DAD)**

Para analizar cualitativamente el extracto metanólico de hojas de *Corynabutilon vitifolium* a través de la cromatografía líquida de alta eficiencia por fase reversa (RP-HPLC), se utilizaron dos detectores: UV-visible y con arreglo de diodos (DAD), con una lectura de la muestra a una longitud de onda de 255 nm.

El extracto metanólico se filtró por un filtro de teflón (PTFE) 0,45  $\mu\text{m}$  posibilitando la eliminación de los contaminantes y partículas en suspensión, aumentando la vida útil de la columna (41). El volumen de inyección fue de 20  $\mu\text{L}$ .

La separación de los componentes presentes en la muestra se hizo a través de una columna C18 que trabajó a una temperatura de 40°C y a un flujo de 1mL/min, condiciones que se mantuvieron controladas gracias a un horno y una bomba cuaternaria, respectivamente. Sin embargo, para mejorar la elución se ocupó un sistema de gradientes (tabla 2) que consistió en TFA 0,1% en agua HPLC (A) y metanol (B): de 0-20 minutos se eluyó con 90% del solvente A y 10% del solvente B, del minuto 20-25 se invirtieron los porcentajes, permitiendo que el solvente A alcance un 30% y B un 70%. Finalmente, del minuto 25-37 se restablecieron las condiciones iniciales (A=90% y B=10%).

Una vez acondicionado el equipo, se inyectó la muestra a una concentración de 10 mg/mL. De la misma forma se procedió para inyectar el estándar de rutina (36 µL) y el *pool* de flavonoides. Entre inyecciones la columna fue reequilibrada durante 10 minutos con solvente A (90%) y solvente B (10%).

La identificación se realizó por medio de la comparación de los tiempos retención ( $T_r$ ) de las muestras y los estándares de rutina, galangina, crisina, kamferol y quercetina.

**Tabla 2.** Fase móvil empleada para eluir las muestra de extracto metanólico de hojas de *Corynabutilon vitifolium* por medio del HPLC-UV y HPLC-DAD, utilizando un sistema de gradiente.

<b>Tiempo (minutos)</b>	<b>Solvente A (%)</b>	<b>Solvente B (%)</b>
0-20	90	10
20-25	30	70
25-37	90	10

Con el fin de confirmar la presencia de rutina en la muestra metanólica se realizó una coinyección con dicho flavonoide a una concentración de 180 µg/mL en HPLC-DAD bajo las mismas condiciones de elución mencionadas anteriormente. Posteriormente, al pico obtenido se le hizo un barrido espectral con DAD, proporcionando las longitudes de onda a la que más absorbe y se comparó con las obtenidas por Zu *et al.* (46) y Lu *et al.* (47).

### **5.2.7.3 Cuantificación de rutina en extractos metanólicos de *Corynabutilon vitifolium***

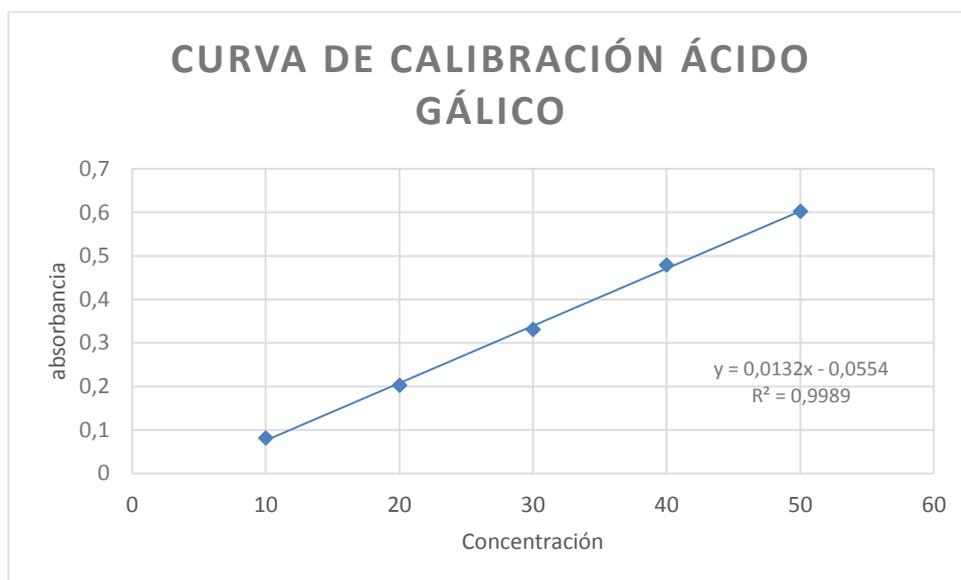
Para cuantificar rutina en la muestra metanólica se elaboró una curva de calibración con el estándar en metanol (360 µg/mL), utilizando concentraciones de 10, 25, 50, 100, 150 y 250 µg/mL que fueron preparadas con agua grado HPLC. Estos se inyectaron en el HPLC acoplado a un detector de arreglo de diodos utilizando idénticas condiciones de temperatura, flujo y gradiente mencionadas anteriormente.

Finalmente, las muestras se eluyeron por triplicado, permitiendo obtener la concentración de rutina en el extracto metanólico de hojas de *Corynabutilon vitifolium*.

## 6. RESULTADOS

### 6.1. Determinación de fenoles totales en extractos metanólicos de *Corynabutilon vitifolium*

Para cuantificar, se elaboró una solución patrón con el estándar de ácido gálico que, posteriormente, permitió la fabricación de una curva de calibración a 5 concentraciones diferentes: 10, 20, 30, 40 y 50  $\mu\text{g/mL}$  (gráfico 1), donde cada una fue realizada por triplicado.



**Gráfico 1.** Curva de calibración obtenida a través del método colorimétrico Folin-Ciocalteu utilizando ácido gálico como estándar a concentraciones de 10, 20, 30, 40 y 50  $\mu\text{g/mL}$ , donde cada punto obtuvo un porcentaje de coeficiente de variación diferente. Se grafica absorbancia versus concentración de ácido gálico ( $\mu\text{g/mL}$ ).

Las muestras del extracto metanólico de *Corynabutilon vitifolium* (5  $\text{mg/mL}$ ) también fueron determinadas por triplicado. Los resultados se muestran en la tabla 3.

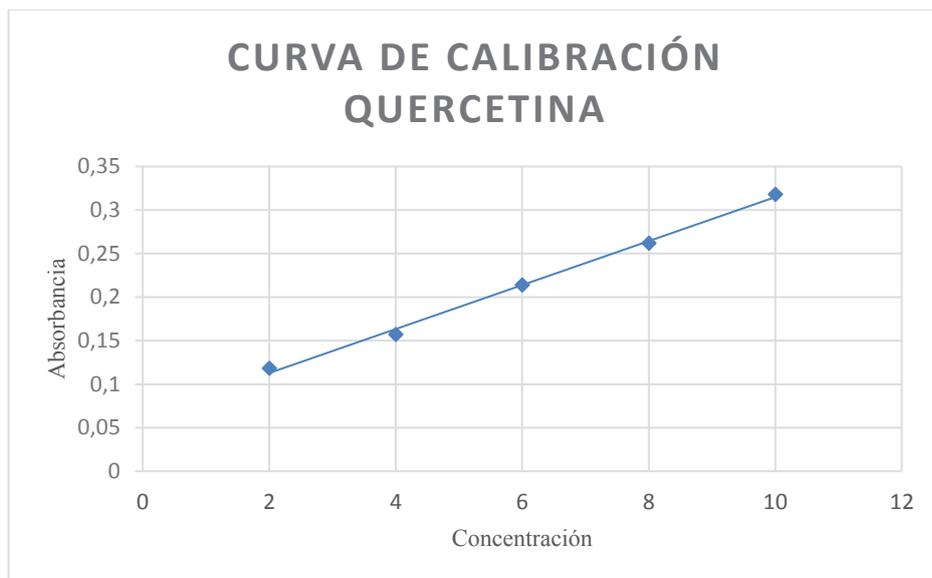
**Tabla 3.** Concentraciones expresadas en  $\mu\text{g/mL}$ , obtenidas a partir del extracto metanólico de *Corynabutilon vitifolium* (5 mg/mL) realizado por triplicado mediante el método colorimétrico Folin-Ciocalteu para la cuantificación de fenoles totales.

	<b>Absorbancia</b>	<b>Concentración (<math>\mu\text{g/mL}</math>)</b>	<b>Promedio (<math>\mu\text{g/mL}</math>)</b>	<b>DE (<math>\pm</math>)</b>	<b>CV (%)</b>
1	0,324	28,62	29,13	0,532	1,83
2	0,330	29,08			
3	0,338	29,69			

Finalmente, el promedio de las concentraciones ( $\mu\text{g/mL}$ ) conseguido a través de los triplicados se expresó como miligramos (mg) equivalentes de ácido gálico por gramo (g) de peso seco: 291,3 mg EAG/g  $\pm$  0,532.

## **6.2. Determinación de flavonoides totales en extractos metanólicos de *Corynabutilon vitifolium***

Para cuantificar, se elaboró una solución patrón con el estándar de quercetina que, posteriormente, permitió la fabricación de una curva de calibración (gráfico 2) a 5 concentraciones diferentes: 2, 4, 6, 8 y 10  $\mu\text{g/mL}$ , donde cada una fue realizada por triplicado.



**Gráfico 2.** Curva de calibración obtenida a través del método colorimétrico cloruro de aluminio, utilizando quercetina como estándar a concentraciones de 2, 4, 6, 8 y 10 µg/mL, donde cada punto obtuvo un porcentaje de coeficiente de variación diferente. Se grafica absorbancia versus concentración de quercetina (µg/mL).

Las muestras del extracto metanólico de *Corynabutilon vitifolium* (10 mg/mL) también fueron determinadas por triplicado. Los resultados se muestran en la tabla 4.

**Tabla 4.** Concentraciones expresadas en µg/mL, obtenidas a partir del extracto metanólico de *Corynabutilon vitifolium* (10 mg/mL) realizados por triplicado mediante el método colorimétrico cloruro de aluminio para la cuantificación de flavonoides totales.

	Absorbancia	Concentración (µg/mL)	Promedio (µg/mL)	DE (±)	CV (%)
1	0,224	6,39	6,80	0,437	6,43%
2	0,233	6,75			
3	0,246	7,26			

Finalmente, el promedio de las concentraciones ( $\mu\text{g/mL}$ ) conseguido a través de los triplicados se expresó como miligramos (mg) equivalentes de quercetina por gramo (g) de peso seco:  $68 \text{ mg EQ/g} \pm 0,437$ .

### 6.3. Evaluación de la capacidad antioxidante a través del ensayo con el radical libre de DPPH

Para evaluar la capacidad antioxidante se elaboró una solución patrón con el estándar de Trolox<sup>®</sup> que, posteriormente permitió la fabricación de tres controles positivos a concentraciones de 50, 200 y 500  $\mu\text{g/mL}$ , donde cada una fue realizada por triplicado. Los resultados se muestran en la tabla 5.

La absorbancia del blanco fue de 0,809.

**Tabla 5.** Porcentaje de inhibición del radical libre de DPPH por los estándares de Trolox<sup>®</sup> a diferentes concentraciones (50, 200 y 500  $\mu\text{g/mL}$ ).

Concentración ( $\mu\text{g/mL}$ )	% inhibición
50	$7,54\% \pm 0,866$
250	$44,42\% \pm 1,175$
500	$72,19\% \pm 1,136$

Las muestras del extracto metanólico de *Corynabutilon vitifolium* (10 mg/mL) también fueron evaluadas por triplicado. Los resultados se muestran en la tabla 6.

**Tabla 6.** Porcentajes de inhibición del radical libre de DPPH, obtenidas a partir del extracto metanólico de *Corynabutilon vitifolium* (10 mg/mL) realizado por triplicado.

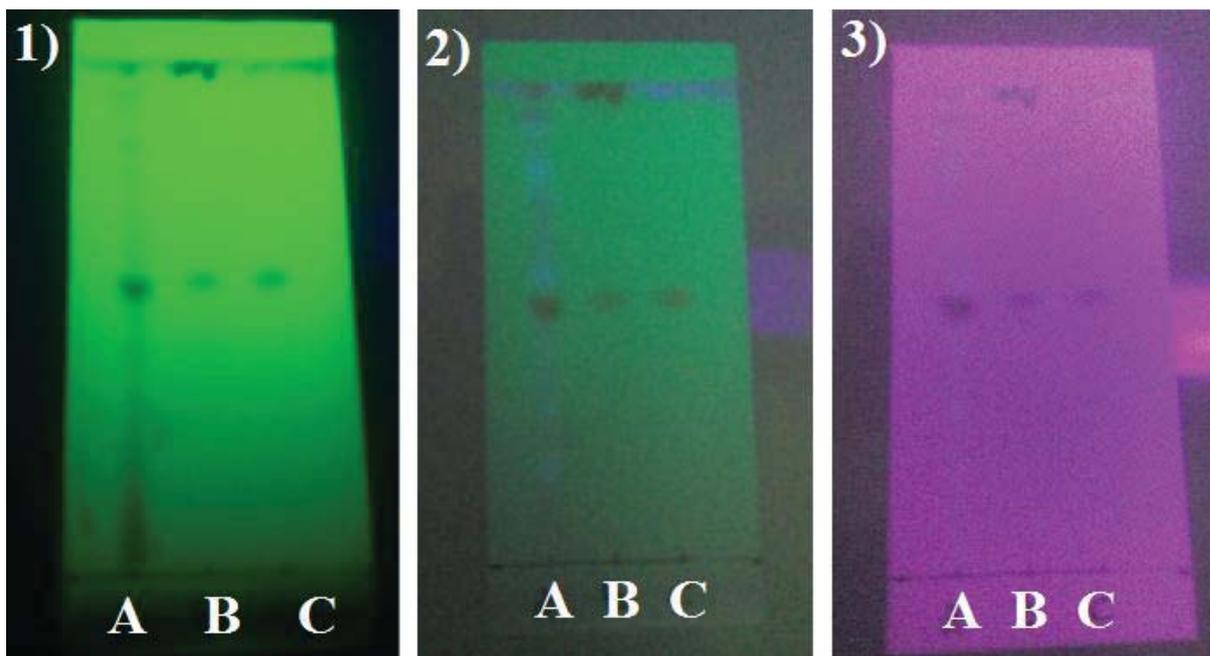
	<b>Absorbancia</b>	<b>% de inhibición</b>	<b>Promedio (%)</b>	<b>DE (±)</b>	<b>CV (%)</b>
1	0,370	54,26%	53,60	0,582	1,09%
2	0,377	53,40%			
3	0,379	53,15%			

El porcentaje de inhibición del radical libre DPPH en los extractos metanólicos de hojas de *Corynabutilon vitifolium* fue de 53,69 % ± 0,582.

#### **6.4 Fingerprints e identificación de rutina en extracto metanólico de *Corynabutilon vitifolium* a través de técnicas cromatográficas**

##### **6.4.1 Identificación de rutina en extracto metanólico de *Corynabutilon vitifolium* mediante cromatografía en capa fina (CCF)**

El ensayo de cromatografía en capa fina permitió visualizar los componentes existentes en el extracto metanólico de hojas de *Corynabutilon vitifolium*, sembrando el extracto metanólico, el pool de flavonoides y el estándar de rutina, en A, B y C, respectivamente (figura 6).



**Figura 6.** Muestras: A (Muestra metanólica *Corynabutilon vitifolium* 100 mg/mL), B (*Pool* de flavonoides: galangina (178  $\mu\text{g/mL}$ ), kamferol (333  $\mu\text{g/mL}$ ), crisina (215  $\mu\text{g/mL}$ ), quercetina (823  $\mu\text{g/mL}$ ) y rutina (301  $\mu\text{g/mL}$ )) sembradas en placas de sílica gel leídas a diferentes longitudes de onda: placa 1: 254nm, placa 2: 302 nm y placa 3: 365 nm.

Para evaluar los componentes que posee el extracto metanólico de hojas de *Corynabutilon vitifolium*, se calculó y se comparó el factor de retención ( $R_f$ ) de cada muestra sembrada (tabla 7) en la lámina de sílica gel, utilizando la siguiente fórmula:

$$R_f = \frac{\text{Distancia recorrida por la muestra}}{\text{Distancia recorrida por la fase móvil}}$$

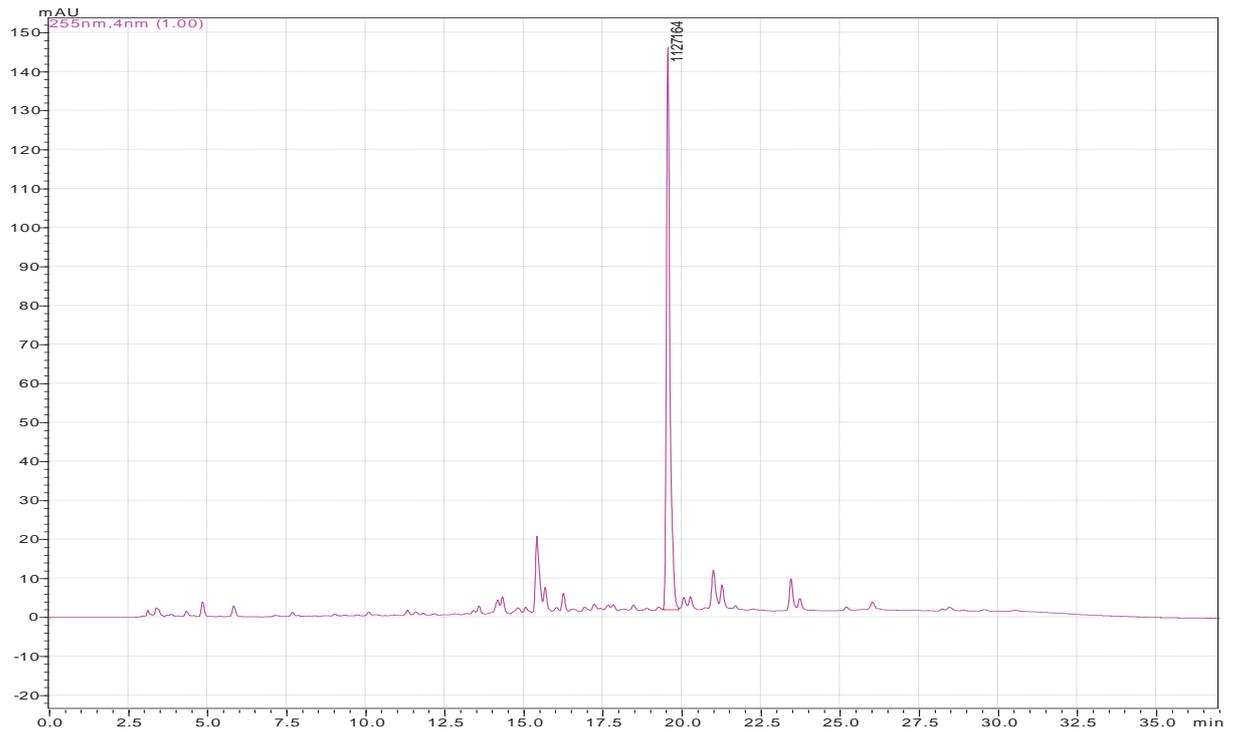
**Tabla 7.** Resultados de los Rf calculados para las muestras A (Muestra metanólica de hojas de *Corynabutilon vitifolium* 100 mg/mL), B (*Pool* se flavonoides) y C (rutina 360 µg/mL) sembradas en silica gel.

<b>Muestras</b>	<b>Rf</b>
A	0,5761
B	0,5870
C	0,5870

Según los resultados obtenidos a partir de la cromatografía en capa fina (CCF) los extractos de hojas de *Corynabutilon vitifolium* dan positivo para el flavonoide rutina.

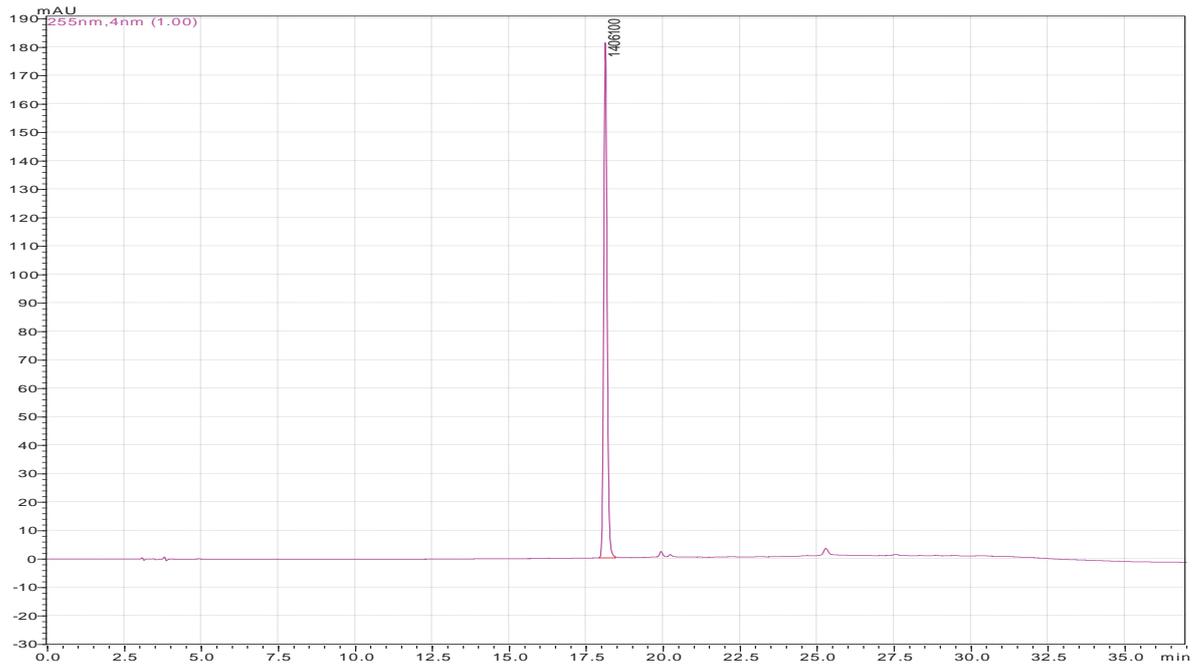
#### **6.4.2 Fingerprints e identificación de rutina en extracto metanólico de *Corynabutilon vitifolium* a través de RP-HPLC acoplado a detector UV-visible**

El cromatograma del extracto metanólico (figura 7) dilució los componentes presentes en la muestra (10 mg/mL), facilitando la identificación de flavonoides. Se utilizaron las condiciones de elución descritas en la metodología. El tiempo de retención del mayor pico fue de 19,533 minutos.



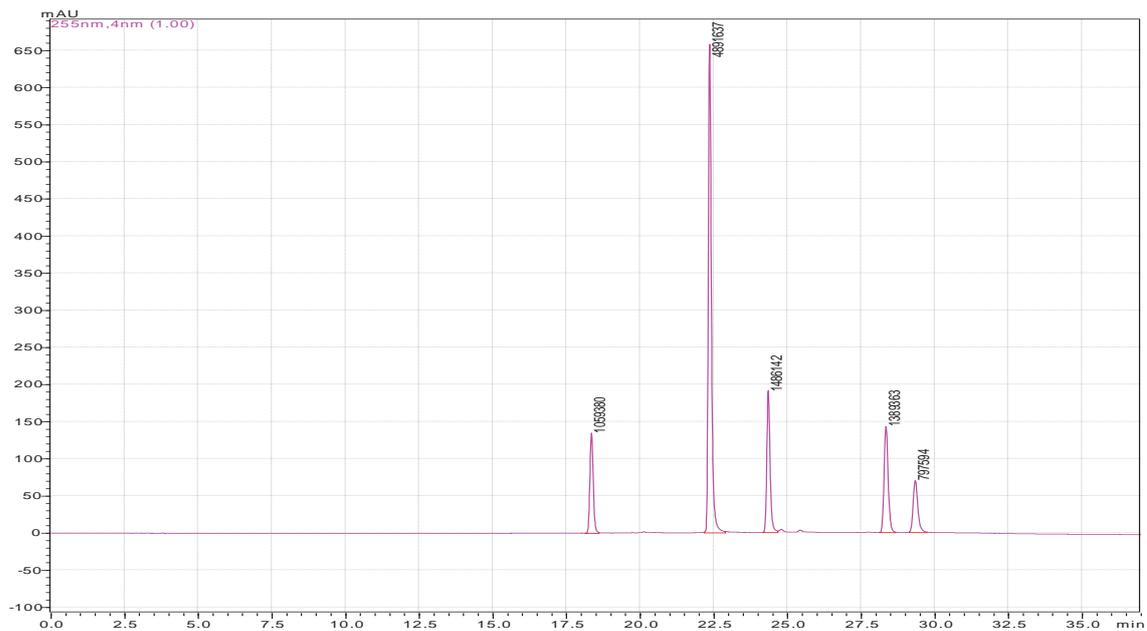
**Figura 7.** Cromatograma obtenido a partir del extracto metanólico de hojas de *Corynabutilon vitifolium* 10 mg/mL diluido en agua HPLC. Volumen de inyección 20  $\mu$ L. Canal de absorbancia 255 nm. Tiempo de corrida 37 minutos.

Para la identificación se utilizó un estándar de rutina (36  $\mu$ g/mL) analizado bajo las mismas condiciones de elución. En el cromatograma obtenido (Figura 8) se puede observar que posee un tiempo de retención ( $T_r=18,111$  minuto) similar a la de la muestra. Las diferencias en los tiempos se pueden deber a variabilidad en la presión, temperatura y solventes, entre otros.



**Figura 8.** Cromatograma estándar de rutina (36  $\mu\text{g/mL}$ ) preparado con agua HPLC. Volumen de inyección 20  $\mu\text{L}$ . Canal de absorbancia: 255 nm. Tiempo de elución 37 minutos.

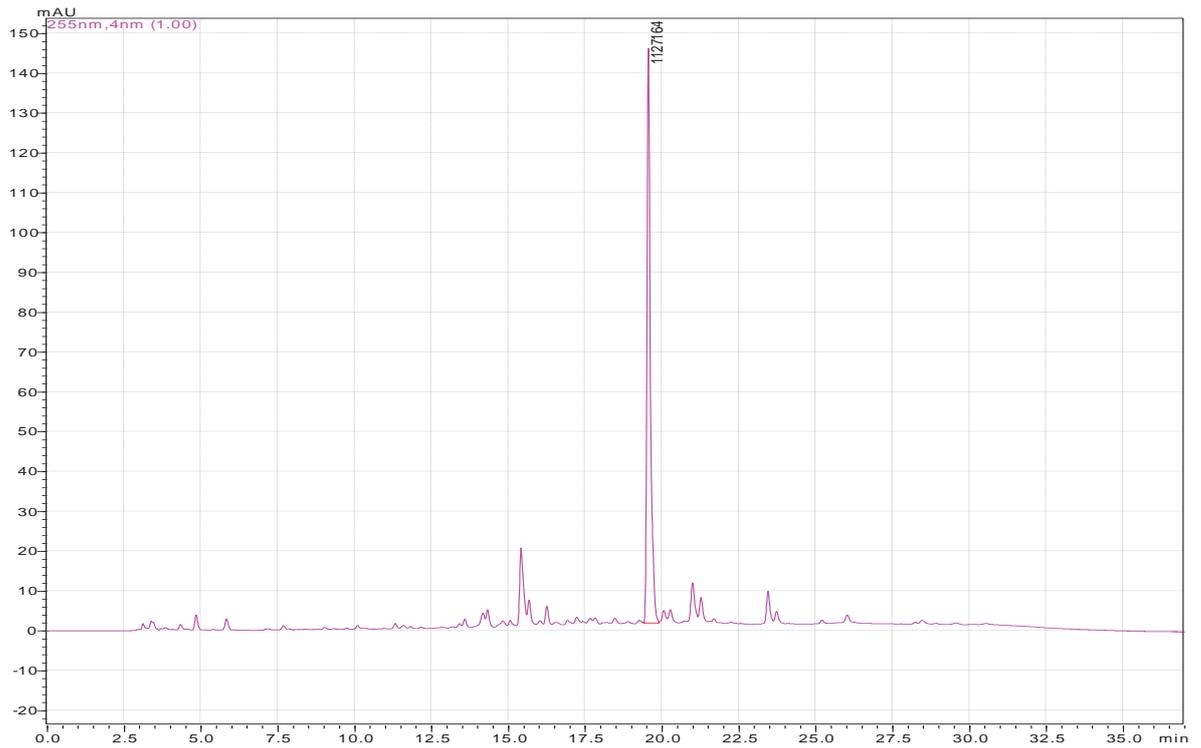
Con el objetivo de identificar otros flavonoides presentes en la muestra metanólica se eluyó un *pool* de flavonoides) que contenía: rutina (30  $\mu\text{g/mL}$ ), quercetina (82  $\mu\text{g/mL}$ ), crisina (22  $\mu\text{g/mL}$ ), kamferol (33  $\mu\text{g/mL}$ ) y galangina (18  $\mu\text{g/mL}$ ). Gracias a los resultados obtenidos en el cromatograma (figura 9), fue posible concluir que la muestra metanólica de las hojas de *Corynabutilon vitifolium*, no posee ninguno de los flavonoides anteriormente mencionados, a excepción de rutina.



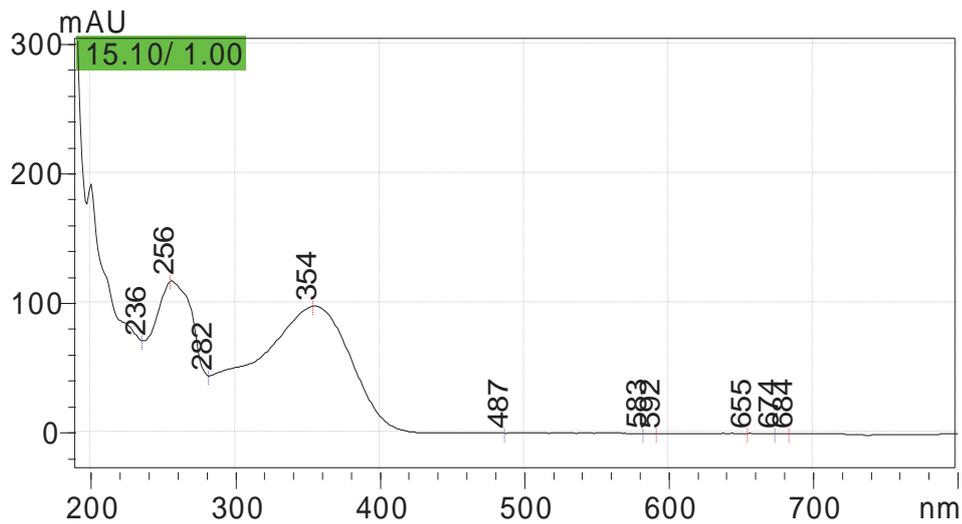
**Figura 9.** Cromatograma *pool* de flavonoides: rutina (30  $\mu\text{g/mL}$ ), quercetina (82  $\mu\text{g/mL}$ ), crisina (22  $\mu\text{g/mL}$ ), kamferol (33  $\mu\text{g/mL}$ ) y galangina (18  $\mu\text{g/mL}$ ), ordenados según aparición en cromatograma. *Pool* preparado en agua HPLC. Volumen de inyección 20  $\mu\text{L}$ . Canal de absorbancia: 255 nm. Tiempo de elución 37 minutos.

#### 6.4.3 *Fingerprints* e identificación de rutina en extracto metanólico de *Corynabutilon vitifolium* a través de RP-HPLC acoplado a detector con arreglo de diodos (DAD)

El cromatograma obtenido (figura 10) a partir del extracto metanólico de *Corynabutilon vitifolium* fue eluido bajo las mismas condiciones anteriormente descritas, presentando un tiempo de retención para rutina de 19,533 minutos y un área de 477410 (mAU x min). Posteriormente, se hizo un barrido espectral del pico máximo (figura 11) presente en el cromatograma, logrando conseguir las longitudes de onda máxima.

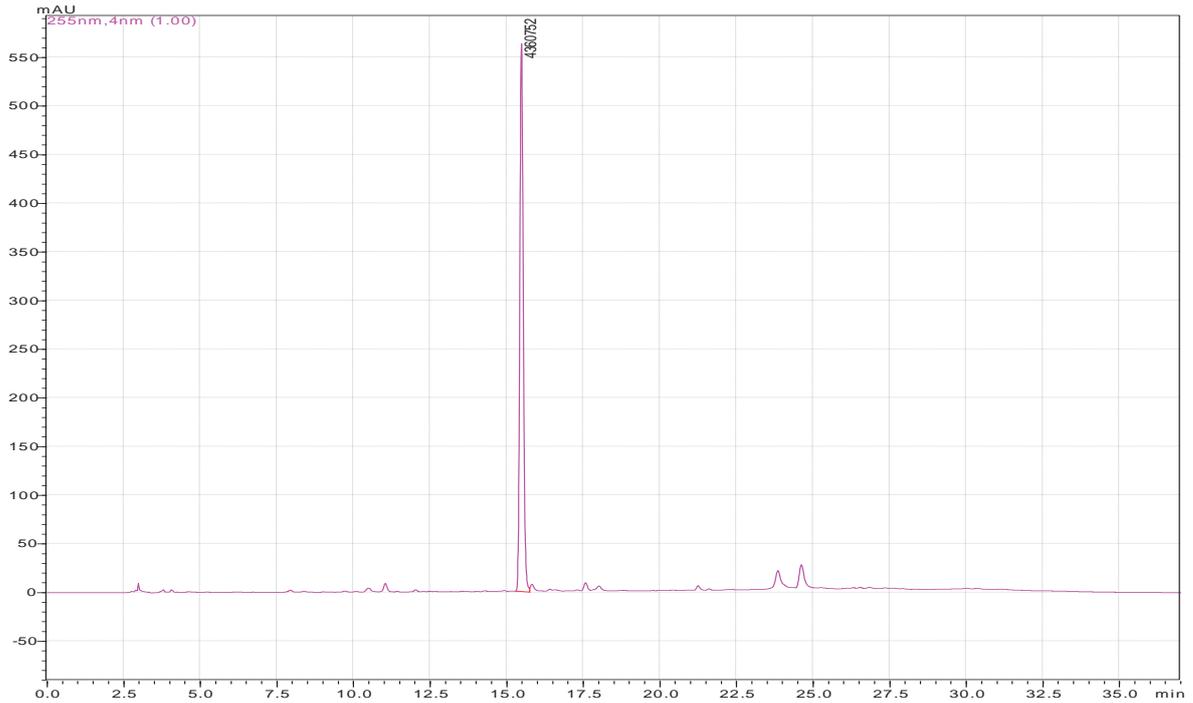


**Figura 10.** Cromatograma extracto metanólico *Corynabutilon vitifolium* (10 mg/mL) preparado con agua HPLC. Volumen de inyección 20  $\mu$ L. Canal de absorbancia: 255 nm. Tiempo de elución 37 minutos.

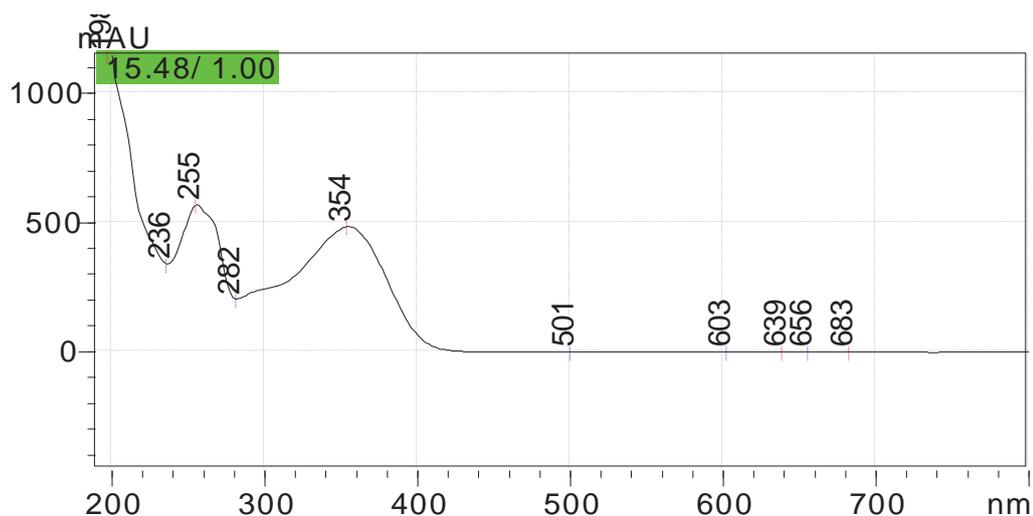


**Figura 11.** Barrido espectral del pico máximo (flavonoide rutina): Muestra metanólica *Corynabutilon vitifolium*, longitud de onda máxima: 256 y 354 nm. Volumen de inyección 20  $\mu$ L.

Para tener certeza de que realmente se identificó rutina, se realizó una coinyección con dicho flavonoide (figura 12) a una concentración de 180  $\mu\text{g}/\text{mL}$  preparado con agua HPLC. Se obtuvo que el pico identificado en la muestra metanólica a los 15,473 minutos incrementó 3.5 veces su área, confirmando la presencia del flavonoide rutina. Además, de igual forma se le efectuó un barrido espectral al pico de la coinyección (figura 13), permitiendo obtener las longitudes onda máxima.



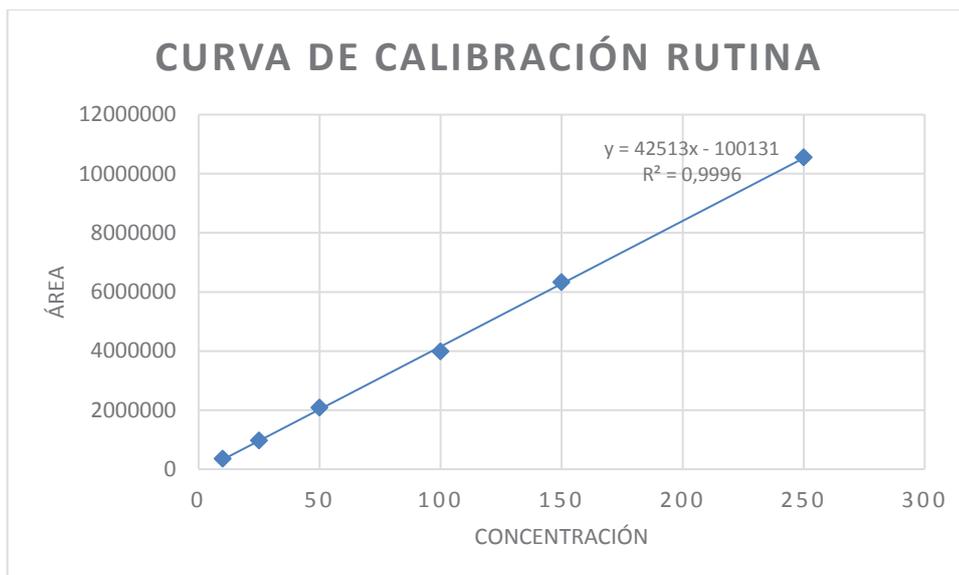
**Figura 12.** Cromatograma extracto metanólico *Corynabutilon vitifolium* coinyección flavonoide rutina (180  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) preparado con agua HPLC. Volumen de inyección 20  $\mu\text{L}$ . Canal de absorbancia: 255 nm. Tiempo de elución 37 minutos.



**Figura 13.** Barrido espectral del pico máximo (flavonoide rutina): Coinyección estándar de rutina (180  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ), longitud de onda máxima : 255 y 354 nm. Volumen de inyección 20  $\mu\text{L}$ .

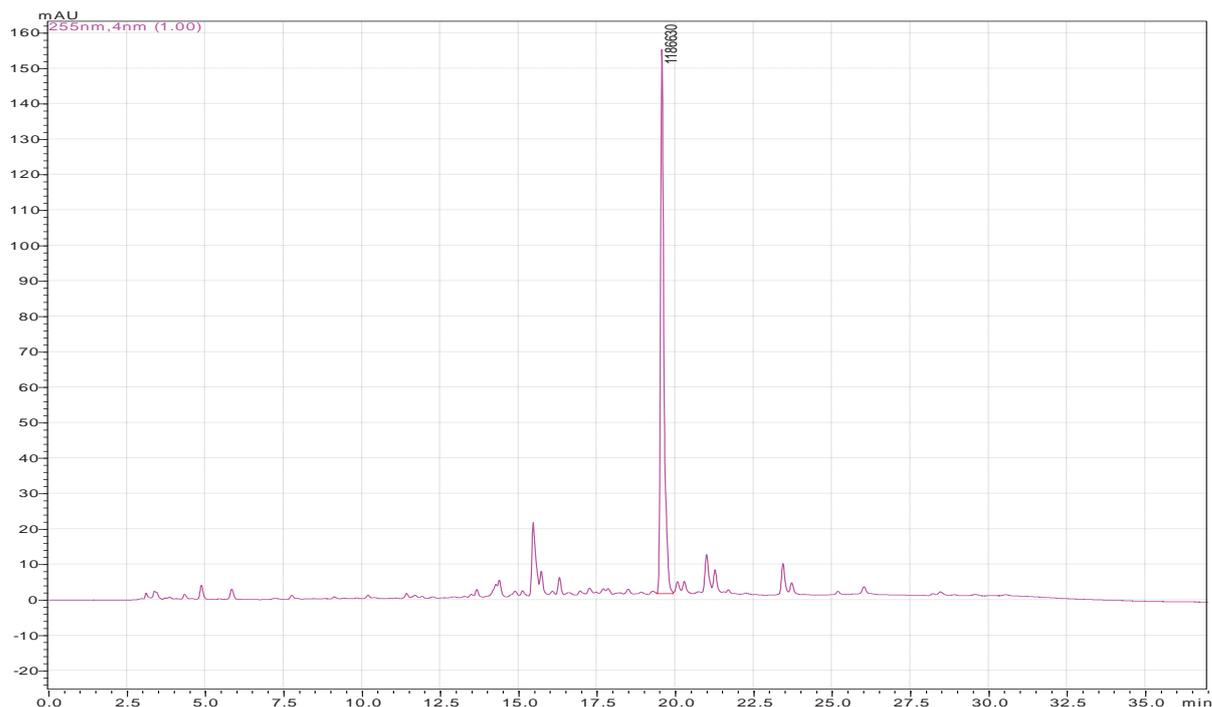
#### 6.4.4 Cuantificación de rutina en extracto metanólico de hojas de *Corynabutilon vitifolium* a través de RP-HPLC acoplado a un detector con arreglo de diodos (DAD)

Para cuantificar, se elaboró una solución patrón con el estándar de rutina que, posteriormente, permitió la fabricación de una curva de calibración (gráfico 3) a 6 concentraciones diferentes: 10, 25, 50, 100, 150 y 250  $\mu\text{g}/\text{mL}$ .



**Gráfico 3.** Curva de calibración con estándar rutina, a concentraciones de: 10, 25, 50, 100, 150 y 250 µg/mL versus área de los picos (mAUx min).

A pesar de que los máximos descritos en literatura por Zu (46) y Lu (47) fueron de 257 y 260 nm, se cuantificó a 255 nm, longitud de onda a la que más absorbió rutina en la muestra. Una vez que los extractos metanólicos de *Corynabutilon vitifolium* fueran eluidos por triplicado (Anexo N°1) se procedió a integrar el pico de rutina tal como se muestra en la figura 14, obteniendo la concentración de dicho flavonoide en la muestra.



**Figura 14.** Cromatograma obtenido a través de la elución triplicado (anexo) del extracto metanólico de *Corynabutilon vitifolium* mediante el empleo de HPLC acoplado a detector con arreglo de diodos (DAD). Volumen de inyección 20  $\mu$ L. Canal de absorbancia 255 nm. Tiempo de elución 37 minutos.

Los resultados obtenidos a partir de los triplicados de extractos metanólicos de hojas de *Corynabutilon vitifolium* se resumen en la tabla 8.

**Tabla 8.** Tiempo de retención, área, altura, concentración, promedio, desviación estándar y coeficiente de variación de los extractos metanólicos de hojas de *Corynabutilon vitifolium* adquiridos por medio de HPLC-DAD.

Muestra	Tr	Área (mAU x min)	Altura (mAU)	Concentración ( $\mu$ g/mL)	Promedio ( $\mu$ g/mL)	DE ( $\pm$ )	CV (%)
1	19,544	1127164	144320	28,869	29,282	0,858	2,928
2	19,533	1120358	145583	28,709			
3	19,558	1186630	153478	30,268			

Por lo tanto, la concentración de rutina en el extracto metanólico de hojas de *Corynabutilon vitifolium* (10 mg/mL) es de  $29,282 \pm 0,858 \mu\text{g/mL}$ .

## 7 . DISCUSIÓN

Las especies vegetales ya no sólo son utilizadas por la medicina popular, sino que también por la industria farmacéutica para la fabricación de fitofármacos y obtención de modelos estructurales para síntesis y hemisíntesis (48). Es por ello que se han originado numerosos estudios que tratan de dilucidar la presencia de compuestos polifenólicos en diversas especies vegetales que son empleadas como medicina en la mayoría de los pueblos originarios. De este modo, en la presente investigación se realizaron ensayos fitoquímicos sobre una especie endémica utilizada por el pueblo mapuche para poder cuantificar el flavonoide rutina y además conocer la capacidad antioxidante de la planta.

El proceso de extracción es uno de los pasos más importantes para obtener polifenoles, el que depende en mayor medida del solvente empleado, temperatura y pH, condiciones que van a facilitar el acceso a la matriz vegetal que se utilice (49). Generalmente se usan solventes de alta polaridad como agua, metanol y etanol que presentan mayor efectividad en la recuperación de compuestos polifenólicos que aquellos más apolares. Sin embargo, a pesar de que el agua es más polar que metanol y etanol, el estudio realizado por Paulino (50) demostró que dicho vehículo obtuvo los peores resultados para la extracción de fenoles y flavonoides. Por otro lado, metanol y etanol son disolventes que han registrado excelentes recuperaciones a partir de diferentes especies vegetales, sin embargo, etanol es el medio preferido por las industrias debido a su baja toxicidad (51). En la presente investigación se empleó metanol, medio que permitió obtener buenos resultados en términos de concentración de polifenoles. Con el objetivo de optimizar la extracción en términos de tiempo y concentración se puede realizar una mezcla de metanol/acetona/agua (7:7:6) o metanol acidificado con ácido clorhídrico (HCl) (los radicales de los flavonoides permanecen neutros en este medio) (52), tal como lo indican los estudios realizados por Krygier (53) y Arts (54), respectivamente. Cabe destacar que al reducir el tiempo de extracción se minimiza la probabilidad de oxidación de los compuestos (55).

Investigaciones realizadas durante años han demostrado que el flavonoide rutina posee una potente actividad biológica actuando como antiinflamatorio y hepatoprotector, permitiendo el empleo de este flavonoide en enfermedades como artritis reumatoide (56) y afecciones hepáticas (cirrosis e inflamación) (57), respectivamente. Precisamente el pueblo mapuche

utiliza *Corynabutilon vitifolium* para mitigar las afecciones anteriormente descritas. En el presente estudio fue posible determinar la presencia del flavonoide rutina por lo que posiblemente las acciones acuñadas por el pueblo mapuche sean gracias a los efectos producidos por dicho flavonoide. Asimismo la medicina tradicional utiliza *Corynabutilon vitifolium* para inducir abortos y tratar partos complicados, sin embargo estas propiedades no se le atribuyen al flavonoide rutina, sino que más bien son características inherentes a algunos alcaloides, tales como veratrina (alcaloide esteroideal), hiosciamina (alcaloide tropano) y solanina (glucoalcaloide), presentes en *Veratrum spp.*, *Datura stramonium* y *Solanum spp.*, respectivamente (58). También existen otros compuestos capaces de ocasionar abortos llamados furanocumarinas (59) (cumarina unida a un anillo furánico), estos son metabolitos secundarios presentes en al menos 15 familias, entre ellas destaca la Familia Rutaceae (60) a la que pertenecen dos especies (*Ruta chalepensis* y *Ruta graveolens*) conocidas por sus potentes propiedades abortivas (61,62). En contraste, Malvaceae no figura dentro de las familias que poseen furanocumarinas (60). Por otro lado, en este estudio no se determinó la presencia de alcaloides y furanocumarinas, en consecuencia no es posible asegurar o descartar la presencia de estos metabolitos. Además, no fue posible evaluar la actividad abortiva de *Corynabutilon vitifolium*, por lo tanto no se puede relacionar el uso ginecológico que el pueblo mapuche le da a la especie con los compuestos determinados en esta investigación.

Para dolencias estomacales también se ingieren infusos de *Corynabutilon vitifolium*, uso que puede estar dado por la presencia del flavonoide rutina, ya que el estudio realizado por De la casa (63) en ratas demuestra que dicho compuesto en sus dosis máximas (120 mg/kg) posee un efecto protector en casos de úlcera péptica. Otro aspecto a analizar del uso que se le da como antigastrálgico es que *Corynabutilon vitifolium* pertenece las Malvaceae, familia que se caracteriza por poseer especies con gran cantidad de mucílago, tales como *Althaea officinalis* (64), *Malva sylvestris* (65) y *Sterculia urens* (66). Este compuesto actúa como emoliente y se ha demostrado que reduce el número y diámetro de las úlceras en ratas, además el mucílago es ocupado por la industria farmacéutica como gelificante (67). A pesar de que en el presente estudio no se realizaron ensayos relacionados a determinar el mucílago, investigaciones anteriores describen que esta especie posee gran cantidad de este compuesto en sus hojas (68), permitiendo de esta forma una eventual relación entre el uso doméstico y los componentes presentes.

En base a los resultados obtenidos no es posible confirmar que *Corynabutilon vitifolium* posea la mayor concentración de compuestos polifenólicos en época estival (periodo del año en que fue recolectada), ya que para poder estimar esto se deberían recolectar muestras en diferentes épocas del año y compararlas mediante estudios fitoquímicos. Sin embargo un estudio realizado por Pacifico en el año 2016 (69), señaló que las mayores concentraciones de polifenoles en *Ruta graveolens* se dan durante la primavera. Sería interesante que estudios posteriores puedan determinar el periodo de mayor concentración de polifenoles para *Corynabutilon vitifolium* y, de esta forma, establecer una posible relación con lo que sucede en otras especies.

A la especie vegetal *Peumus boldus* más conocida como boldo se le atribuyen propiedades antioxidantes y antiinflamatorias debido a la presencia de polifenoles en sus hojas (70). La investigación realizada por Muñoz (71) en infusos de boldo demostró poseer mayor concentración de fenoles totales que otras hierbas de uso común como manzanilla, limón y hierbabuena. Otro estudio realizado por Soto (72) en extractos acuosos de las hojas secas y pulverizadas de boldo (20 mg/mL) indicó que poseen aproximadamente 23,0 mg EAG/g de peso seco, mientras que en el extracto metanólico de hojas secas y pulverizadas de *Corynabutilon vitifolium* (5 mg/mL) fue de 291,3 mg EAG/g de peso seco. A pesar de que el infuso de boldo posee una concentración mayor al extracto metanólico de huella, esta última especie posee mayor cantidad de fenoles lo que se puede deber a la extracción, ya que se ha demostrado que la recuperación de fenoles es mayor en metanol que en agua (51).

La concentración de flavonoides totales en los extractos metanólicos de *Corynabutilon vitifolium* (10 mg/mL) fueron comparados con los flavonoides totales conseguidos en extractos metanólicos de *Ruta chalepensis* (130 mg/mL) investigado por Kacem (73), ya que para ambos estudios se utilizaron condiciones similares de extracción. Para la primera especie mencionada se obtuvo una concentración promedio de  $68 \pm 0,437$  mg EQ/g de peso seco y para la segunda se documentó una concentración de  $8,23 \pm 0,1$  mg EC/g de peso seco. De esta manera se demuestra que los flavonoides contenidos en las hojas de *Corynabutilon vitifolium* superan en más de 100 veces a los presentes en *Ruta chalepensis*. En la misma investigación hecha por Kacem se dilucidó que el mejor rendimiento para la extracción de flavonoides totales se obtuvo con etanol, indicando que se puede mejorar la recuperación de flavonoides en *Corynabutilon vitifolium*.

La capacidad antioxidante de los extractos metanólicos de *Corynabutilon vitifolium* (10 mg/mL) fue comparada con los extractos acuosos de *Camellia sinensis* (50 mg/mL), especie investigada por Yen (74) en el año 1995. El porcentaje de inhibición para la primera especie mencionada fue de 53,6%, mientras que para la segunda fue de 59,4% y, a pesar de que la concentración en el caso de *Camellia sinensis* es considerablemente mayor, los porcentajes de inhibición de ambas especies fueron similares. Tal como se mencionó anteriormente, el solvente utilizado para *Corynabutilon vitifolium* fue metanol y para *Camellia sinensis* agua, la diferencia en los vehículos utilizados afecta directamente al rendimiento en la extracción de compuestos antioxidantes (50). Además, se consiguen tener capacidades antioxidantes semejantes a pesar de que el extracto metanólico de *Corynabutilon vitifolium* presenta menor concentración que el extracto acuoso de *Camellia sinensis*. Este comportamiento puede ser explicado por que el metanol extrae una mayor cantidad de compuestos polifenólicos que el agua (75), y de esta forma al obtener mayores cantidades de estas sustancias antioxidantes, se consiguen porcentajes de inhibición mas altos en el ensayo de DPPH.

Para obtener los cromatogramas de *Corynabutilon vitifolium* se utilizó RP-HPLC, técnica que se caracteriza por ser confiable, barata y simple (76). En esta investigación los *fingerprints* mostraron que los picos presentes fueron simétricos y bien separados, siendo el pico más intenso identificado como rutina que tuvo su máximo de absorbancia a los 255 nm en contraste con los ensayos realizados por Zu *et al.* (46) y Lu *et al.* (47), registrando mayor intensidad de pico a 257 y 260 nm, respectivamente. La variabilidad en las longitudes de onda de los estudios mencionados anteriormente se puede deber a las diferentes columnas, fases móviles, volúmenes de inyección y equipos cromatográficos empleados para la elución de extractos.

Al no existir estudios previos de cuantificación de rutina en la especie *Corynabutilon vitifolium*, se comparó con las investigaciones hechas por Ueng (77) en *Ruta graveolens*, especie conocida por su alto contenido de rutina. El extracto acuoso de *Ruta graveolens* (10 mg/mL) presenta un promedio de  $237,0 \pm 0,3$   $\mu\text{g/mL}$  de rutina, en cambio el extracto metanólico *Corynabutilon vitifolium* (10 mg/mL) posee un promedio de  $29,282 \pm 0,858$   $\mu\text{g/mL}$  de rutina, concentración ocho veces menor que la de *Ruta graveolens*. A pesar de que en el presente estudio la extracción de rutina se hizo con metanol, solvente que ha demostrado mejor recuperación de rutina que el agua, las concentraciones fueron notablemente inferiores. No obstante, si se quiere mejorar la extracción de rutina se puede utilizar etanol, solvente que se prefiere por sobre el metanol, ya que es más rentable y no es tóxico. Además si se emplea una

mezcla hidroalcohólica (50-50%) la recuperación de rutina aumenta. Aun así, si se prefiere seguir trabajando con metanol la optimización de extracción de rutina se puede realizar mediante el uso de un baño de ultrasonido que disminuye considerablemente el tiempo de extracción (78).

Los estudios *in vivo* e *in vitro* realizados por Shen (79) en ratones, demostraron que la dosis efectiva de rutina para producir la acción antiinflamatoria fue de 6 mg/kg, esto se condice con lo que existe en el comercio, ya que hay comprimidos de 500 mg de dicho flavonoide que se toman una vez por día (80). Por lo tanto, para lograr el efecto antiinflamatorio de un comprimido de 500 mg se necesitarían 170,8 gramos de hojas secas y pulverizadas de *Corynabutilon vitifolium* y para completar el tratamiento de un mes se requerirían 5,124 kg de hojas secas y pulverizadas. Sin embargo se debe tener en cuenta que el pueblo mapuche consume esta especie mayoritariamente como infuso y no como extracto metanólico, por lo que presumiblemente se necesitarían mayores cantidades de hojas secas y pulverizadas de *Corynabutilon vitifolium* para producir un efecto antiinflamatorio similar.

Este tipo de estudios sirven para caracterizar y conocer las especies vegetales que son consumidas por pueblos originarios y de esta forma, aportan a validar el uso de especies endémicas en la medicina tradicional. Adicionalmente, los resultados de esta investigación contribuyen a complementar la información existente de *Corynabutilon vitifolium* y constituyen la base para posteriores estudios en especies endémicas de nuestro país.

## 8. CONCLUSIONES

- Las acciones terapéuticas acuñadas por el pueblo mapuche a la especie *Corynabutilon vitifolium*, no se pueden relacionar con las propiedades del flavonoide rutina, pues para llegar a producir el efecto deseado se necesitarían grandes cantidades de hojas secas y pulverizadas de la especie. Asimismo no se determinó la presencia de compuestos relacionados a la actividad abortiva como lo son los alcaloides y furanocumarinas.
- Este estudio ayudó a complementar la información existente aportada por Reyes & Vega en 1984 y por Mølgaard *et al.* en 2011, ya que se evaluó la actividad antioxidante, se determinaron flavonoides y fenoles totales y se cuantificó el flavonoide rutina, propiedades que hasta el día de hoy eran desconocidas en la especie *Corynabutilon vitifolium*.
- Este tipo de investigaciones no sólo sirven para caracterizar las especies vegetales que son consumidas por pueblos originarios, sino que también contribuyen a dar los conocimientos necesarios para que la medicina mapuche se pueda validar y, eventualmente, ser una opción legítima y confiable ante el proceso de salud-enfermedad.

## 9. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Errázuriz A. Manual de geografía de Chile. 3a ed. Santiago: Editorial Andrés Bello; 1998. 443 p.
2. Yang L, Zhan L, Li J, Rodney D. Genetic structure of *Pinus henryi* and *Pinus tabuliformis*: Natural landscapes as significant barriers to gene flow among populations. *Biochem Syst Ecol.* 2015;61:124–32.
3. Urbina R, Saldivia P, Scherson R. Systematic considerations of Chilean endemic vascular plant families and genera. *Gayana bot.* 2015;72(2):272–95.
4. Instituto nacional de estadística. Censo 2012 [Internet]. 2012. 2016 [cited 2016 May 20]. Available from: <http://www.ine.cl/>
5. Bengoa J. Historia del pueblo mapuche (Siglo XIX y XX). 3a ed. Santiago de Chile: SUR; 1996. 423 p.
6. Schnettler B, Miranda H, Mora M, Lobos G, Viviani JL, Sepúlveda J, et al. Acculturation and consumption of foodstuffs among the main indigenous people in Chile. *Int J Intercult Relations* [Internet]. Elsevier Ltd; 2013;37(2):249–59. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijintrel.2012.08.003>
7. Villagran C, Villa R, Hinojosa LF, Sanchez G, Romo M, Maldonado A, et al. ethnozoology : a preliminary study. *Rev Chil Hist Nat.* 1999;72:595–627.
8. Mella E. Los mapuches ante la justicia: la criminalización de la protesta indígena en Chile. Santiago de Chile: LOM Ediciones, Observatorio de Derechos de los Pueblos Indígenas & IWGIA; 2007. 203 p.
9. Ochoa JJ, Ladio AH. Current use of wild plants with edible underground storage organs in a rural population of Patagonia : between tradition and change. *J Ethnobiol Ethnomed* [Internet]. *Journal of Ethnobiology and Ethnomedicine*; 2015;11(70):1–14. Available from: <http://dx.doi.org/10.1186/s13002-015-0053-z>
10. Cianelli R, Araya A, Matsumoto C, Miner S. HIV Issues and Mapuches in Chile. *J Assoc nurses AIDS care.* 2008;19(3):235–41.

11. Molares S, Ladio A. Ethnobotanical review of the Mapuche medicinal flora : Use patterns on a regional scale. 2009;122:251–60.
12. Ladio A, Lozada M, Weigandt M. Comparison of traditional wild plant knowledge between aboriginal communities inhabiting arid and forest environments in Patagonia , Argentina. *J Arid Environ.* 2007;69:695–715.
13. Herrera AV, Alarcón AM. Organización cultural de la enfermedad y estructuras semánticas : Enfermedades músculo-esqueléticas de la población Mapuche de Chile . *Rev Antropol Iberoam.* 2014;9:35–52.
14. Mølgaard P, Holler JG, Asar B, Liberna I, Rosenbæk LB, Jebjerg CP, et al. Antimicrobial evaluation of Huilliche plant medicine used to treat wounds. Vol. 138, *Journal of Ethnopharmacology.* 2011. p. 219–27.
15. Shikov A, Pozharitskaya O, Makarov V, Wagner H, Verpoorte R, Heinrich M. Medicinal Plants of the Russian Pharmacopoeia; their history and applications. *J Ethnopharmacol.* 2014;154:481–536.
16. Molares S, Ladio A. Chemosensory perception and medicinal plants for digestive ailments in a Mapuche community in NW Patagonia , Argentina. 2009;123:397–406.
17. Fotakis C, Tsigrimani D, Tsiaka T, Lantzouraki DZ, Strati IF, Makris C, et al. Metabolic and antioxidant profiles of herbal infusions and decoctions. *Food Chem.* 2016;
18. Jiménez A, Delgado C, Rufián J. Antioxidant capacity, total phenols and color profile during the storage of selected plants used for infusion. *Food Chem.* 2016;339–46.
19. Du G, Sun L, Zhao R, Du L, Song J, Zhang L, et al. Polyphenols: Potential source of drugs for the treatment of ischaemic heart disease. *Pharmacol Ther.* 2016;
20. Ming L, Zheng X, Hong Z. Where do health benefits of flavonoids come from? Insights from flavonoid targets and their evolutionary history. *Biochem Biophys Res Commun.* 2013;434(4):701–4.
21. Fenga C, Li S, Yina D, Zhanga H, Tianc D, Wua Q, et al. Rapid determination of flavonoids in plumules of sacred lotus cultivars and assessment of their antioxidant activities. *Ind Crops Prod.* 2016;87:96–104.
22. Fryxell P. The American genera of Malvaceae II. *Brittonia.* 1997;49(2):204–69.

23. Oliveira M, Yara D, Cursino A, Izídio S. An approach to chemotaxonomy to the fatty acid content of some Malvaceae species. *Biochem Syst Ecol* [Internet]. Elsevier Ltd; 2010;38(5):1035–8. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.bse.2010.10.006>
24. Ministerio del medio ambiente. Inventario nacional de especies de Chile [Internet]. 2016. 2016 [cited 2016 May 8]. Available from: [www.mma.gob.cl/](http://www.mma.gob.cl/)
25. Muñoz M, Moreira A, Moreira S. Origen del nombre de los géneros de plantas vasculares nativas de Chile y su representatividad en Chile y el mundo. *Gayana bot.* 2012;69(2):309–59.
26. Hoffmann A. Flora silvestre de Chile. Zona central. Santiago de Chile: Fundación Claudio Gay; 1978. 254 p.
27. Muñoz O. Plantas medicinales de uso en Chile; Química y farmacología. Santiago de Chile: Editorial universitaria; 2001. 334 p.
28. Wilhelm de Mösbach E. Botánica indígena de Chile. Santiago de Chile: Edit. Andrés Bello.; 1991. 140 p.
29. Booa H-O, Hwang S-J, Bae C-S, Parkc S-H, Heo B-G, Gorinsteine S. Extraction and characterization of some natural plant pigments. *Ind Crops Prod.* 2012;40:129–35.
30. Martínez S, González JM, Tuñón M José. Revisión Los flavonoides: propiedades y acciones antioxidantes. *Nutr hosp.* 2002;XVII(6):271–8.
31. Koirala N, Thuan NH, Ghimire GP, Thang D Van, Sohng JK. Methylation of flavonoids: Chemical structures, bioactivities, progress and perspectives for biotechnological production. *Enzyme Microb Technol* [Internet]. Elsevier Inc.; 2016;86:103–16. Available from: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0141022916300175>
32. Pubchem. Rutin (5280805) [Internet]. 2016 [cited 2016 May 21]. p. 1. Available from: [pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compunds/80805](http://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compunds/80805)
33. Drugbank. Rutin (01688) [Internet]. 2016 [cited 2016 May 21]. p. 1. Available from: [www.drugbank.ca/drugs/DB01698](http://www.drugbank.ca/drugs/DB01698)
34. Na J, Song K, Kim S, Kwon J. Rutin protects rat articular chondrocytes against oxidative stress induced by hydrogen peroxide through SIRT1 activation. *Biochem Biophys Res Commun.* 2016;473:1301–8.

35. Luo Z, Murray B, Ross A-L, Povey MJW, Morgan, Michael R.A. Day AJ. Effects of pH on the ability of flavonoids to act as Pickering emulsion stabilizers. *Colloids Surfaces B Biointerfaces*. 2012;92:84–90.
36. Jovanovic S, Steenken S, Tosic M, Marjanovic B, Simic MG. Flavonoids as Antioxidants. *J Am Chem Soc*. 1994;116(11):4846–51.
37. Ferreira T, Dillenburg Meinhart, Adriana Ballus, Cristiano Augusto Teixeira Godoy H. The effect of the duration of infusion, temperature, and water volume on the rutin content in the preparation of mate tea beverages: An optimization study. *Food Res Int*. 2014;60:241–5.
38. Jeszka MK, Kowiak A. Determination of antioxidant activity, rutin, quercetin, phenolic acids and trace elements in tea infusions: Influence of citric acid addition on extraction of metals. *J Food Compos Anal*. 2015;40:70–7.
39. Sharma S, Ali A, Ali J, Sahni JK, Baboota S. Rutin: therapeutic potential and recent advances in drug delivery. *Expert Opin Investig Drugs*. 2013;22(8):1063–79.
40. Ganeshpurkar A, Saluja A. The Pharmacological Potential of Rutin. *Saudi Pharm J*. 2016;
41. Sharapin N. Fundamentos de tecnología de productos fitoterapéuticos. Pinzón R, editor. Santiago de Chile: Convenio Andres Bello; 2000. 247 p.
42. Singleton V., Joseph A, Rossi JRJA. Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents. *Am J Enol Vitic*. 1965;16:144–58.
43. Jagadish LK, Krishnan, V. V. Shenbhagaraman R, Kaviyaran V. Comparative study on the antioxidant, anticancer and antimicrobial property of *Agaricus bisporus* (J. E. Lange) Imbach before and after boiling. *African J Biotechnol*. 2009;8(4):654–61.
44. Kara M, Sahin H, Turumtay H, Dinc S, Gumuscu A. The Phenolic Composition and Antioxidant Activity of Tea with different Parts of *Sideritis condensata* at Different Steeping Conditions. *J Food Nutr Res*. 2014;2(5):258–62.
45. Wagner H, Sabine B. *Plant drug analysis: A Thin Layer Chromatography Atlas*. 2a ed. Berlin: Springer Science & Business Media; 1996. 384 p.
46. Zu Y, Li C, Fu Y, Zhao C. Simultaneous determination of catechin, rutin, quercetin

- kaempferol and isorhamnetin in the extract of sea buckthorn (*Hippophae rhamnoides* L.) leaves by RP-HPLC with DAD. *J Pharm Biomed Anal.* 2006;41:714–9.
47. Lu Y, Liu Z, Wang Z, Wei D. Quality evaluation of *Platycladus orientalis* (L.) Franco through simultaneous determination of four bioactive flavonoids by high-performance liquid chromatography. *J Pharm Biomed Anal.* 2006;41:1186–90.
  48. Pferschy EM, Bauer R. The relevance of pharmacognosy in pharmacological research on herbal medicinal products. *Epilepsy Behav* [Internet]. Elsevier Inc.; 2015;52:344–62. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.yebeh.2015.05.037>
  49. José M, Soto R, Espinosa T, Ramírez M. Optimización del proceso de extracción de flavonoides de flor de manzanilla (*Matricaria recutita* L.). *Agrociencia.* 2008;42(4).
  50. Paulino C, Kessler A, Ochoa M, De Michelis A. Compuestos bioactivos en frutas pequeñas de la patagonia Argentina: efecto del solvente de extracción en su determinación cuantitativa. *ReCiteIA.* 2013;12(2).
  51. Li B, Smith B, Hossain M. Extraction of phenolics from citrus peels I. Solvent extraction method. *Sep Purif Technol.* 2006;48:182–8.
  52. Martínez-Flórez S, González-Gallego J, Culebras M, Tuñón M. J. Los flavonoides: propiedades y acciones antioxidantes. *Nutr Hosp.* 2002;17(6):271–8.
  53. Krygier K, Sosulski F, Hogge L. Free, esterified, and insoluble-bound phenolic acids. Extraction and purification procedure. *J Agric Food Chem.* 1982;30(2):330–4.
  54. Arts I, Van De Putte B, Hollman P. Catechin contents of foods commonly consumed in The Netherlands. Fruits, vegetables, staple foods, and processed foods. *J Agric Food Chem.* 2000;48(5):1746–51.
  55. Arranz Martínez S. Compuestos polifenólicos (extraíbles y no extraíbles) en alimentos de la dieta española: Metodología para su determinación e identificación. 2010.
  56. Guardia T, Rotelli AE, Juárez AO, Pelzer LE. Anti-inflammatory properties of plant flavonoids. Effects of rutin, quercetin and hesperidin on adjuvant arthritis in rat. *Farm.* 2001;56(9):683–7.
  57. Khan RA, Khan MR, Sahreen S. CCl<sub>4</sub>-induced hepatotoxicity: protective effect of rutin on p53, CYP2E1 and the antioxidative status in rat. *BMC Complement Altern Med.*

- 2012;12:178.
58. Kristanc L, Kreft S. European medicinal and edible plants associated with subacute and chronic toxicity part I: Plants with carcinogenic, teratogenic and endocrine-disrupting effects. *Food Chem Toxicol.* 2016;92:150–64.
  59. Kong Y, Lau C, But P, Cheng K, Waterman P. Antifertility principle of *Ruta graveolens*. *Planta Med.* 1989;55(2):176–8.
  60. Attia G, Abou K, Ibrahim, Sayed A. Biotransformation of furanocoumarins by *Cunninghamella elegans*. *Bull Fac Pharm.* 2015;53:1–4.
  61. Gutiérrez J, Zúñiga L, Pino J. *Ruta graveolens* aqueous extract retards mouse preimplantation embryo development. *Reprod Toxicol.* 2003;17:667–72.
  62. França J, Nascimento A. Chemical composition and antibacterial activity of *Ruta graveolens* L. (Rutaceae) volatile oils, from São Luís, Maranhão, Brazil. *South African J Bot.* 2015;99:103–6.
  63. De la Casa C, Villegas I, Alarcón de la Lastra C, Motilva V, Calero M. M. Evidence for protective and antioxidant properties of rutin, a natural flavone, against ethanol induced gastric lesions. *J Ethnopharmacol.* 2000;71(1-2):45–53.
  64. Valizadeh R, Hemmati AA, Bayat, Gholamreza Houshmand S, Bahadoram M. Wound healing potential of *Althaea officinalis* flower mucilage in rabbit full thickness wounds. *Asian Pac J Trop Biomed.* 2015;5(11):937–43.
  65. Samavati V, Manoochehrizade A. Polysaccharide extraction from *Malva sylvestris* and its anti-oxidant activity. *Int J Biol Macromol.* 2013;60:427–36.
  66. Kubal J, Gralén N. Physicochemical properties of Karaya gum and locust bean mucilage. *J Colloid Sci [Internet].* 1948;3(5):457–71. Available from: <http://www.botanical-online.com/medicinalesmucilagos.htm>
  67. Prajapati VD, Jani GK, Moradiya NG, Randeria NP. Pharmaceutical applications of various natural gums, mucilages and their modified forms. *Carbohydr Polym.* 2013;92:1685–99.
  68. Ibaca RC. Monografía de árboles y arbustos chilenos con propiedades medicinales y aromáticas. Universidad de Concepción; 2001.

69. Pacifico S, Piccolella S, Galasso S, Fiorentino A, Kretschmer N, Pan S-P, et al. Influence of harvest season on chemical composition and bioactivity of wild rue plant hydroalcoholic extracts. *Food Chem Toxicol.* 2016;90:102–11.
70. Ortiz M, Silva G, Tapia M, Rodriguez JC, Lagunes A, Santillán-Ortega C, et al. Toxicity of Boldo *Peumus boldus* Molina for *Sitophilus zeamais* Motschulsky and *Tribolium castaneum* Herbst. *Agric Res.* 2012;72(3).
71. Muñoz E, Rivas K, Loarca MG, Mendoza S, Reynoso R, Ramos M. Comparación del contenido fenólico, capacidad antioxidante y actividad antiinflamatoria de infusiones herbales comerciales. *Rev Mex ciencias agrícolas.* 2012;3(3).
72. Soto C, Caballero E, Pérez E, Zúñiga ME. Effect of extraction conditions on total phenolic content and antioxidant capacity of pretreated wild *Peumus boldus* leaves from Chile. *Food Bioprod Process.* 2014;92:328–33.
73. Kacem M, Kacem I, Simon G, Mansour A Ben, Chaabouni S, Elfeki A, et al. Phytochemicals and biological activities of *Ruta chalepensis* L. growing in Tunisia. *Food Biosci.* 2015;12:73–83.
74. Yen G, Chen H. Antioxidant activity of various tea extracts in relation to their antimutagenicity. *J Agric Food Chem.* 1995;43:27–32.
75. Boeing JS, Barizão ÉO, Silva BC, Montanher P, Visentainer V de cinco A, Vergilio J. Evaluation of solvent effect on the extraction of phenolic compounds and antioxidant capacities from the berries: application of principal component analysis. *Chem Cent J.* 2014;8:48.
76. He J, Wu X, Kuang Y, Wang T, Bi K, Li Q. Quality assessment of *Chrysanthemum indicum* Flower by simultaneous quantification of six major ingredients using a single reference standard combined with HPLC fingerprint analysis. *Asian J Pharm Sci.* 2016;2:265–72.
77. Ueng Y, Chen C, Huang Y, Lee I, Yun C, Chen Y, et al. Effects of aqueous extract of *Ruta graveolens* and its ingredients on cytochrome P450, uridine diphosphate (UDP)-glucuronosyltransferase, and reduced nicotinamide adenine dinucleotide (phosphate) (NAD(P)H)-quinone oxidoreductase in mice. *J Food Drug Anal.* 2015;23:516–28.

78. Chua LS. A review on plant-based rutin extraction methods and its pharmacological activities. *J Ethnopharmacol.* 2013;150:805–17.
79. Shena S, Leec W, Lind H, Huangd H, Kod C, Yangd L, et al. In vitro and in vivo inhibitory activities of rutin, wogonin, and quercetin on lipopolysaccharide-induced nitric oxide and prostaglandin E2 production. *Eur J Pharmacol.* 2002;446(1-3):187–94.
80. Solgar suplementos. Rutina 500 mg comprimidos [Internet]. Productos. [cited 2016 Aug 6]. p. 1. Available from: [http://www.solgarsuplementos.es/nav/productos/productos/p\\_vitaminaC/Rutina500mg\\_Comprimidos.html](http://www.solgarsuplementos.es/nav/productos/productos/p_vitaminaC/Rutina500mg_Comprimidos.html)

## **10. ANEXOS**

## Anexo N°1

Cromatogramas obtenidos a través de la elución por triplicado del extracto metanólico de *Corynabutilon vitifolium* mediante el empleo de HPLC acoplado a detector con arreglo de diodos (DAD). Volumen de inyección 20  $\mu$ L. Canal de absorbancia 255 nm. Tiempo de elución 37 minutos.

