



UNIVERSIDAD DE CHILE  
Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas  
Departamento de Bioquímica y Biología Molecular

EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE Y  
DETERMINACIÓN DEL CONTENIDO DE FENOLES TOTALES Y  
FLAVONOIDES DE HOJAS DE DIFERENTES GENOTIPOS DE  
*UGNI MOLINAE* TURCZ.

**PAULA DENISSE VALENZUELA BUSTAMANTE**

**Memoria para optar el título de Químico Farmacéutico**

**Profesora Patrocinante**

DRA. LORENA GARCÍA NANNIG

Departamento de Bioquímica y  
Biología Molecular

**Directoras de memoria**

DRA. CARLA DELPORTE VERGARA

Depto. de Química Farmacológica y  
Toxicológica

DRA. LORENA GARCÍA NANNIG

Departamento de Bioquímica y Biología  
Molecular

**Santiago, Chile**

**2015**

*A mis padres*

## **AGRADECIMIENTOS**

En mi primer lugar quiero agradecer a mis padres y a mi hermano, los pilares fundamentales de mi vida, ya que sin su compañía esta meta habría sido mucho más difícil de lograr.

Gracias a mi mamá, Pamela Bustamante, por su preocupación, sus consejos y por el amor incondicional que me entrega cada día. Gracias por sus palabras de aliento en los momentos difíciles y por confiar siempre en mí y en mis capacidades.

Gracias a mi papá, Félix Valenzuela, por su apoyo durante todos estos años, por su esfuerzo y dedicación y por motivarme siempre a seguir adelante para cumplir mis objetivos.

Gracias a mis abuelos, a mis tías y tíos, quienes también han sido parte fundamental de mi vida durante este tiempo. Gracias por su compañía, por su alegría y preocupación.

A mis primas, Karin y Javiera, por las risas y el cariño incondicional que me entregaron durante todos mis estudios.

A Rodrigo Pérez (Rorro), por apoyarme durante todos estos años, por alentarme a seguir cuando no tenía esperanzas, por confiar en mí y por no dejarme caer en los momentos difíciles. Gracias por su paciencia, cariño y por todo el amor que me ha entregado.

Gracias a la profesora Carla Delporte, por haber confiado en mí para el desarrollo de esta tesis, por su gran apoyo y preocupación durante este tiempo y por todos los conocimientos que me ha transmitido.

Gracias a todo el equipo del laboratorio de Productos Naturales, por su simpatía, cariño y por haberme integrado como uno de ustedes. A David Aravena, Paola Guzmán y profesora Lorena García por su disposición a ayudarme cada vez que lo necesitaba y, en especial, gracias a Marcelo Peña y Gabriela Valenzuela por toda la ayuda que me han brindado, por todo lo que me han enseñado y por ser las buenas personas que son.

A mis amigas y amigos de la universidad, Camila Chávez, Marcela Yáñez, Javiera Suazo, Skarlett Pincol y Rubén Veas, por todos los buenos momentos que pasamos juntos en el transcurso de la carrera, por sus palabras de apoyo y por alegrarme la vida en estos años.

Finalmente, agradezco a todas aquellas personas que fueron parte de esta importante etapa de mi vida.

**ESTA TESIS FUE FINANCIADA POR**

Proyecto FONDECYT 1130155, dirigido por la Dra. Carla Delporte Vergara

## TABLA DE CONTENIDOS

ÍNDICE DE FIGURAS.....	IV
ÍNDICE DE TABLAS.....	VI
ÍNDICE DE ANEXOS.....	VII
ABREVIATURAS.....	X
RESUMEN.....	XII
ABSTRACT.....	XIII
I. INTRODUCCIÓN.....	1
1.1 Estrés oxidativo y rol de los antioxidantes en la salud.....	2
II. HIPÓTESIS.....	6
III. OBJETIVOS.....	6
3.1. Objetivos generales.....	6
3.2. Objetivos específicos.....	6
IV. MATERIALES Y MÉTODOS.....	7
4.1. Reactivos.....	7
4.2. Material vegetal.....	8
4.3 Estudio químico.....	9
4.3.1. Preparación de los extractos etanólicos (EETs) seriados de hojas de <i>U. molinae</i> .....	9
4.3.2. Cromatografía en capa fina (CCF).....	11

4.3.3. Cuantificación de la composición fenólica de los EETs.....	11
4.3.3.1. Determinación del contenido fenólico total: ensayo de Folin-Ciocalteu.....	12
4.3.3.2. Determinación del contenido de flavonas y flavonoles: reacción con AlCl <sub>3</sub> .....	14
4.4. Estudios farmacológicos <i>in vitro</i>	
4.4.1. Evaluación de la actividad antioxidante <i>in vitro</i> : ensayo FRAP ( <i>Ferric Reducing Antioxidant Power</i> ).....	17
4.4.2. Ensayo de inhibición de la enzima xantina oxidasa (XO).....	21
V. RESULTADOS Y DISCUSIONES.....	25
5.1.1. Rendimientos de EETs de hojas de <i>Ugni molinae</i> .....	25
5.1.2. CCF de los EETs de cada genotipo.....	26
5.1.3. Cuantificación de la composición fenólica de los EETs.....	28
5.1.3.1. Determinación del contenido fenólico total mediante el ensayo de Folin-Ciocalteu.....	28
5.1.3.2. Determinación del contenido de flavonas y flavonoles con AlCl <sub>3</sub> .....	31
5.2. Estudios farmacológicos <i>in vitro</i> .....	35
5.2.1. Evaluación de la actividad antioxidante <i>in vitro</i> : ensayo FRAP.....	35

5.2.1.2 Correlación entre el valor FRAP, contenido fenólico total y contenido de flavonas y flavonoles de los EETs de hojas de murta.....	41
5.2.3. Ensayo de inhibición de la enzima XO.....	43
VI. CONCLUSIONES.....	48
VII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	50



## ÍNDICE DE FIGURAS

<b>FIGURA 1.</b> Fotografía de <i>U. molinae</i> , Parque Nacional Vicente Pérez Rosales, X Región de los Lagos.....	2
<b>FIGURA 2.</b> Estructura de polifenoles identificados en extractos de hojas de murta.....	3
<b>FIGURA 3.</b> Neutralización de especies reactivas del oxígeno (ERO) por flavonoides.....	4
<b>FIGURA 4.</b> Esquema del proceso de extracción seriada de las hojas de murtillo, realizado con cada uno de los 10 genotipos.....	10
<b>FIGURA 5.</b> Esqueleto molecular de los flavonoides: flavonas y flavonoles.....	15
<b>FIGURA 6.</b> Reacción involucrada en el ensayo FRAP.....	18
<b>FIGURA 7.</b> a) Oxidación de xantina a ácido úrico catalizada por XDH, y b) Oxidación de xantina a ácido úrico catalizada por XO.....	22
<b>FIGURA 8.</b> CCF 1 de los EETs de los distintos genotipos de murtillo (optimizada para patrón de rutina).....	27
<b>FIGURA 9.</b> CCF 2 de los EET de los distintos genotipos de murtillo (optimizada para patrones de quercetina y ácido gálico).....	27
<b>FIGURA 10.</b> Curva de calibración para el ensayo de Folin-Ciocalteu.....	28
<b>FIGURA 11.</b> Gráfica de la cantidad de fenoles totales obtenidos para los EETs de los 10 genotipos de hojas de <i>U. molinae</i> .....	30
<b>FIGURA 12.</b> Curva de calibración para el ensayo colorimétrico con AlCl <sub>3</sub> .....	31
<b>FIGURA 13.</b> Cantidad de flavonas y flavonoles obtenidos para los EET de los 10 genotipos hojas de <i>U. molinae</i> .....	33

<b>FIGURA 14.</b> Correlación entre CFT y flavonoides de los 10 EETs de hojas de <i>U. molinae</i> .....	34
<b>FIGURA 15.</b> Curva de calibración del ensayo FRAP.....	35
<b>FIGURA 16.</b> Valores FRAP obtenidos a los 4, 30 y 60 minutos de los 10 EETs de hojas de <i>U. molinae</i> .....	37
<b>FIGURA 17.</b> Curvas de cinética FRAP de los patrones de trolox, miricitrina y quercetina y de un EET de <i>U. molinae</i> (genotipo ZF-18).....	39
<b>FIGURA 18.</b> Correlación entre el valor FRAP, CFT y contenido de flavonoides de los 10 EETs de hojas de los 10 genotipos <i>U. molinae</i> .....	41
<b>FIGURA 19.</b> a) Correlación entre el valor FRAP y el CFT y b) correlación entre el valor FRAP y la cantidad de flavonoides de los EETs de los 10 genotipos de hojas de <i>U. molinae</i> .....	42
<b>FIGURA 20.</b> Porcentaje de inhibición de XO vs concentración ( $\mu\text{g/mL}$ ) de alopurinol.....	44
<b>FIGURA 21.</b> Estructura básica de los flavonoides.....	47

## ÍNDICE DE TABLAS

<b>Tabla 1.</b> Procedencia y criterios de selección de los genotipos de <i>Ugni molinae</i> utilizados en este estudio.....	9
<b>Tabla 2.</b> Condiciones cromatográficas para evidenciar la presencia de polifenoles por CCF.....	11
<b>Tabla 3.</b> Protocolo para el ensayo de Folin-Ciocalteu.....	14
<b>Tabla 4.</b> Protocolo para en ensayo colorimétrico con AlCl <sub>3</sub> .....	16
<b>Tabla 5.</b> Protocolo para el ensayo FRAP.....	20
<b>Tabla 6.</b> Protocolo para el ensayo de inhibición de xantina oxidasa.....	24
<b>Tabla 7.</b> Porcentaje (%) de los rendimientos de los extractos obtenidos para cada genotipo de <i>U. molinae</i> .....	25
<b>Tabla 8.</b> Contenido de fenoles totales de los EETs de hojas de 10 genotipos de <i>U. molinae</i> .....	29
<b>Tabla 9.</b> Cantidad de flavonas y flavonoles de los EETs de las hojas de 10 genotipos de <i>U. molinae</i> .....	32
<b>Tabla 10.</b> Valor FRAP de los EETs de hojas de <i>U. molinae</i> .....	36
<b>Tabla 11.</b> CI <sub>50</sub> y % de inhibición de XO por alopurinol.....	43
<b>Tabla 12.</b> Porcentaje de inhibición sobre XO de los EETs de hojas de murtilla.....	45
<b>Tabla 13.</b> Resumen de los resultados obtenidos para los diferentes EETs de hojas de <i>U. molinae</i> analizados.....	47

## ÍNDICE DE ANEXOS

<b>Anexo 1.</b> Tablas de diferencias significativas entre los EETs de los 10 genotipos de hojas de murtila, para cada ensayo realizado.....	56
<b>Anexo 1A.</b> Diferencias significativas respecto al contenido de fenoles totales: ensayo de Folin-Ciocalteu.....	56
<b>Anexo 1B.</b> Diferencias significativas respecto al contenido de flavonoides: ensayo colorimétrico con $AlCl_3$ .....	57
<b>Anexo 1C.</b> Diferencias significativas respecto al valor FRAP calculado a los 4 minutos: ensayo FRAP.....	57
<b>Anexo 1D.</b> Diferencias significativas respecto al valor FRAP calculado a los 30 minutos: ensayo FRAP.....	58
<b>Anexo 1E.</b> Diferencias significativas respecto al valor FRAP calculado a los 60 minutos: ensayo FRAP.....	58
<b>Anexo 2.</b> Curvas de cinética FRAP obtenidas para los EETs de hojas de murtila de cada genotipo analizado.....	59
<b>Anexo 2A.</b> Curva de cinética FRAP del EET 8-2.....	59
<b>Anexo 2B.</b> Curva de cinética FRAP del EET 14-4.....	59
<b>Anexo 2C.</b> Curva de cinética FRAP del EET 19-1.....	59
<b>Anexo 2D.</b> Curva de cinética FRAP del EET 19-1 ha.....	59
<b>Anexo 2E.</b> Curva de cinética FRAP del EET 19-2.....	60
<b>Anexo 2F.</b> Curva de cinética FRAP del EET 22-1.....	60
<b>Anexo 2G.</b> Curva de cinética FRAP del EET 23-2.....	60

<b>Anexo 2H.</b> Curva de cinética FRAP del EET 27-1.....	60
<b>Anexo 2I.</b> Curva de cinética FRAP del EET 31-1.....	60
<b>Anexo 2J.</b> Curva de cinética FRAP del EET ZF-18.....	60
<b>Anexo 3.</b> Fotografías de los testigos herbarios de los 10 genotipos de <i>U. molinae</i> .....	61
<b>Anexo 3A.</b> Testigo herbario de murtilla, genotipo 8-2.....	61
<b>Anexo 3B.</b> Testigo herbario de murtilla, genotipo 14-4.....	61
<b>Anexo 3C.</b> Testigo herbario de murtilla, genotipo 19-1.....	61
<b>Anexo 3D.</b> Testigo herbario de murtilla, genotipo 19-1 ha.....	61
<b>Anexo 3E.</b> Testigo herbario de murtilla, genotipo 19-2.....	61
<b>Anexo 3F.</b> Testigo herbario de murtilla, genotipo 22-1.....	61
<b>Anexo 3G.</b> Testigo herbario de murtilla, genotipo 23-2.....	62
<b>Anexo 3H.</b> Testigo herbario de murtilla, genotipo 27-.....	62
<b>Anexo 3I.</b> Testigo herbario de murtilla, genotipo 31-1.....	62
<b>Anexo 3J.</b> Testigo herbario de murtilla, genotipo ZF-18.....	62
<b>Anexo 4.</b> Estructuras químicas de los patrones utilizados en el estudio	
<b>Anexo 4A.</b> Patrón de quercetina.....	63
<b>Anexo 4B.</b> Patrón de rutina.....	63
<b>Anexo 4C.</b> Patrón de miricitrina.....	63
<b>Anexo 4D.</b> Patrón de ácido gálico.....	63
<b>Anexo 4E.</b> Patrón de trolox.....	63

**Anexo 5.** Resúmenes de congresos asistidos

**Anexo 5A.** Determination of phenolic and flavonoid content, and evaluation of the reductive capacity over  $\text{Fe}^{3+}$  of different *Ugni molinae* genotypes. 14th International Congress of Ethnopharmacology ISE 2014 (Puerto Varas, Chile, September 23 - 26, 2014).....64

**Anexo 5B.** Diferencias en el valor FRAP y contenido fenólico entre diferentes genotipos de *Ugni molinae* Turcz. 2° Congreso Latinoamericano de plantas medicinales (Santiago, Chile, 12-14 de Agosto, 2014).....65

## **ABREVIATURAS**

% p/p	: Porcentaje peso/peso
AE	: Acetato de etilo
AG	: Ácido gálico
Aprox.	: Aproximadamente
CCF	: Cromatografía en capa fina
CFT	: Contenido fenólico total
CI <sub>50</sub>	: Concentración inhibitoria 50
DCM	: Diclorometano
DMSO	: Dimetilsulfóxido
DS	: Desviación estándar
EAE	: Extracto de acetato de etilo de hojas de murtila
EDCM	: Extracto de diclorometano de hojas de murtila
EET(s)	: Extracto(s) etanólico(s) de hojas de murtila
EH	: Extracto hexánico de hojas de murtila
ERO	: Especies Reactivas del Oxígeno
ES	: Extracto seco de las hojas de murtila
EtOH	: Etanol
FAD/FADH <sub>2</sub>	: Flavina adenina dinucleótido
F-C	: Folin-Ciocalteu
Fe <sup>3+</sup> -TPTZ	: Complejo ferrico-2,4,6,tripiridil-s-triazina
Fl-O•	: Radical flavonoide
FRAP	: Ferric Reducing Antioxidant Power (capacidad antioxidante para reducir el hierro férrico)

HEX	: Hexano
INIA	: Instituto Nacional de Investigaciones Agropecuarias
$\log P$	: Coeficiente de reparto
MeOH	: Metanol
NAD <sup>+</sup> /NADH	: Nicotinamida adenina dinucleótido
NP/PEG	: Reactivo revelador Natural Product/Polietilenglicol
O <sub>2</sub> <sup>-</sup>	: Anión superóxido
OH	: Radical hidroxilo
Q	: Quercetina
RF-C	: Reactivo de Folin-Ciocalteu
Rf	: Factor de retardo
Ru	: Rutina
TPTZ	: 2,4,6,tripiridil-s-triazina
Trolox	: ácido 6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcromano-2-carboxílico
UA	: Unidades de absorbancia
<i>U. molinae</i>	: <i>Ugni molinae</i>
UV	: Luz ultravioleta
XOR	: Xantino oxidorreductasa
XO	: Xantina oxidasa
XDH	: Xantina deshidrogenasa



## Resumen

*Ugni molinae*, Myrtaceae, es un arbusto silvestre que crece en el sur de Chile, especialmente en la cordillera de la Costa y parte de la precordillera andina. La planta produce frutos globosos y pequeños, de agradable sabor y aroma, y las infusiones de sus hojas han sido utilizadas por la medicina folclórica para el tratamiento de distintos tipos de dolor e inflamación. Las propiedades de la murtila se deben, en parte, a la presencia de diferentes compuestos fenólicos en sus hojas. Debido a que estos compuestos pueden variar por diversos factores, como el genotipo, en este estudio se realizó un análisis comparativo respecto a la capacidad antioxidante (ensayo FRAP), el contenido fenólico total (CFT) (ensayo de Folin-Ciocalteu) y el contenido de flavonoides (ensayo colorimétrico con  $\text{AlCl}_3$ ) de extractos etanólicos seriados (EETs) de hojas de 10 genotipos de murtila (8-2, 14-4, 19-1, 19-1ha, 22-1, 23-2, 27-1, 31-1 y ZF-18), los cuales fueron cultivados bajo las mismas condiciones.

De acuerdo a los resultados obtenidos, los EETs de los 10 genotipos presentaron diferencias significativas entre sí ( $p < 0,05$ ), siendo el EET ZF-18 el que obtuvo el mayor CFT, ( $260,6 \pm 3,7$  mg EAG/g ES) y el genotipo 31-1 el que obtuvo la mayor cantidad de flavonoides ( $53,5 \pm 0,8$  mg quercetina/g ES). En relación a la actividad antioxidante, los EETs de los genotipos ZF-18 y 27-1 fueron los que obtuvieron los mayores valores FRAP en todos los distintos tiempos de medición, con un máximo de  $5,40 \pm 0,12$  y  $4,93 \pm 0,05$  mmol  $\text{Fe}^{2+}$ /g ES a los 60 minutos, respectivamente.

La información de esta memoria permitió aportar a los estudios realizados con hojas murtila en el laboratorio de Productos Naturales de la Universidad de Chile, principalmente en relación a la influencia del genotipo sobre su composición fenólica y actividad antioxidante.

## **Abstract**

### **Evaluation of antioxidant activity and determination of total phenolic content and flavonoids of leaves from different *Ugni molinae* Turcz genotypes**

*Ugni molinae* is a wild shrub that grows in southern Chile, predominantly on the andean foothills. The infusion of its leaves have been used by folk medicine for the treatment of different kinds of pain and inflammation, and its properties are due in part to the presence of different phenolic compounds on its leaves. Because of the variation due to numerous factors like the genotype, a comparative study has been made with regards to the antioxidant capacity (FRAP assay), the total phenolics (CFT) (Folin-Ciocalteu assay) and the flavonoid content (colorimetric  $\text{AlCl}_3$  assay) of serialized ethanolic extracts (EETs) of leaves of 10 different genotypes of murtila (8-2, 14-4, 19-1, 19-1ha, 19-2, 22-1, 23-2, 27-1, 31-1 and ZF-18), grown under the same conditions.

Significant differences were found ( $p < 0.05$ ) between the EETs of the 10 genotypes, being the ZF-18 EET the one that got the greater CFT, ( $260.6 \pm 3.7$  mg GAE/g dm) and the 31-1 the one that got the greater quantity of flavonoids ( $53.5 \pm 0.8$  mg quercetin/g dm). In relation to the antioxidant activity, the EETs of the ZF-18 and 27-1 genotypes were the ones that obtained the greater FRAP values at the various time measurements, with a maximum of  $5.40 \pm 0.12$  and  $4.93 \pm 0.05$  mmol  $\text{Fe}^{2+}$ /g dm, respectively.

The information on this work allowed us to contribute to the studies already carried out on murtila leaves by the Natural Products Laboratory of the Universidad de Chile, primarily in relation to the influences of the genotype over its phenolic composition and antioxidant activity.

## I. INTRODUCCIÓN

*Ugni molinae* Turcz. (**FIGURA 1**) es un arbusto chileno perteneciente a la familia Myrtaceae, llamado vulgarmente “murtilla”, “murta” o “uñi” (Avello *et al.*, 2009). En la medicina tradicional chilena, la murtilla se ha utilizado como antiinflamatoria y analgésica para distintos tipos de dolor (Delporte *et al.*, 2007) y su distribución va desde la región del Maule hasta la isla de Chiloé, incluyendo el archipiélago de Juan Fernández (Avello *et al.*, 2013). La planta produce bayas globosas y pequeñas, de agradable sabor y aroma (Seguel *et al.*, 2000), las cuales han sido recolectadas históricamente por las comunidades costeras de la zona sur de Chile, tanto para la elaboración de alimentos para el autoconsumo (mermeladas, conservas y licores) como para la generación de ingresos a través de la comercialización local de pequeños volúmenes del fruto y productos artesanales derivados (Águila y Nahuelhual, 2008).

En el Laboratorio de Productos Naturales de nuestra Facultad se han realizado diversos estudios, entre los cuales se ha demostrado que la administración tópica de diferentes extractos obtenidos desde las hojas de murta tienen un efecto antinociceptivo y antiinflamatorio dependientes de la dosis (Delporte *et al.*, 2007). Mediante un estudio químico se demostró que los extractos de diclorometano, acetato de etilo y etanol contienen triterpenoides pentacíclicos, como los ácidos betulínico, corosólico, alfitólico, ursólico, oleanólico, asiático (Aguirre *et al.*, 2006, Delporte *et al.*, 2007), y los ácidos madecásico y maslínico responsables en parte de la actividad antiinflamatoria y analgésica de las hojas (Goity *et al.*, 2013).



**FIGURA 1. Rama con frutos de *U. molinae*, Parque Nacional Vicente Pérez Rosales, X Región de los Lagos**

También son de gran importancia los estudios realizados para evaluar la actividad antioxidante de las hojas de murtila (Rubilar *et al.*, 2006, Rubilar *et al.*, 2011, Avello *et al.*, 2013, Alfaro *et al.*, 2013, Hauser *et al.*, 2014), y dichos estudios se han realizado tanto *in vitro* como *in vivo* (Avello *et al.*, 2013). Por otro lado, este potencial antioxidante, en conjunto con la actividad antimicrobiana que se ha evaluado en las hojas, podría ser de gran utilidad para la conservación de alimentos, como ha sido demostrado por Hauser *et al.* (2011).

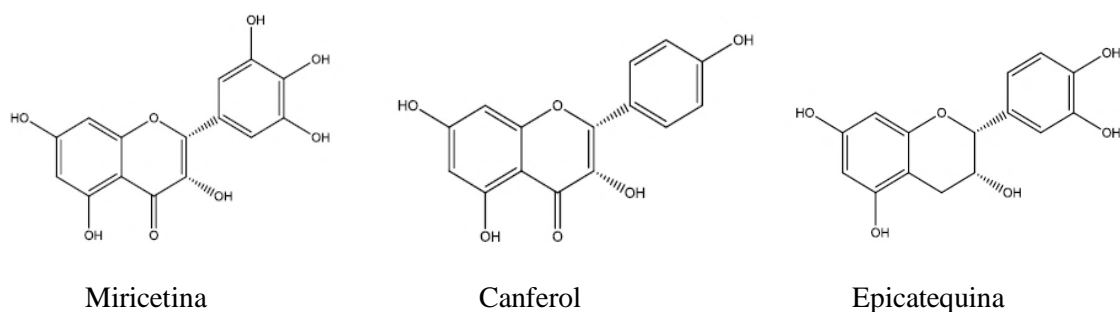
### **1.1. Estrés oxidativo y rol de los antioxidantes en la salud**

Durante los últimos años, el estrés oxidativo ha sido implicado en el desarrollo de diferentes patologías, como diabetes y enfermedades cardiovasculares. Este estrés oxidativo se produce cuando existe un desbalance entre la generación de especies reactivas del oxígeno (ERO) y los sistemas de defensa antioxidante de nuestro organismo, los cuales se ven sobrepasados (Rodrigo y Gil-Becerra., 2014). Las ERO contribuyen al envejecimiento celular, mutagénesis, carcinogénesis y enfermedades

coronarias, posiblemente a través de la desestabilización de membranas, daño al ADN y oxidación de lipoproteínas de baja densidad (LDL) (Heim *et al.*, 2002).

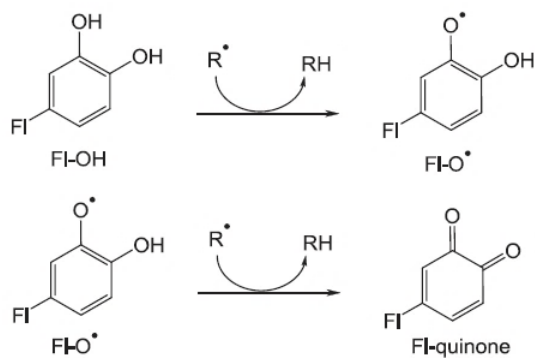
Un antioxidante es una sustancia capaz de neutralizar la acción oxidante de los radicales libres, los cuales, al ser átomos o grupos de átomos con un electrón desapareado, son muy reactivos ya que tienden a captar un electrón de moléculas estables con el fin de alcanzar su estabilidad electroquímica (Avello y Suwalsky, 2006). Un antioxidante también se puede definir como cualquier sustancia que, cuando está presente en bajas concentraciones comparadas con un sustrato oxidable, previene o retarda significativamente la oxidación de ese sustrato (Halliwell *et al.*, 1995).

Las propiedades antioxidantes de los extractos de acetato de etilo y etanólico obtenidos de hojas de murtila se deben, en parte, a la presencia de diferentes compuestos fenólicos y a su capacidad para neutralizar radicales libres. Entre los polifenoles que han sido identificados en las hojas de murtila se encuentran taninos y flavonoides como epicatequina, miricetina, ácido gálico y heterósidos flavónicos tales como ramnósidos, xilósidos y glucósidos de miricetina y quercetina y glucósidos de canferol (**FIGURA 2**) (Rubilar *et al.*, 2006).



**FIGURA 2. Estructura de compuestos fenólicos identificados en hojas de murta**

Los flavonoides son derivados benzo- $\gamma$ -pirona y corresponden a una extensa clase de compuestos fenólicos provenientes de las plantas, los cuales ofrecen protección frente a patógenos, herbívoros y a la radiación ultravioleta. La mayoría de sus efectos beneficiosos para la salud son atribuidos a sus propiedades antioxidantes y quelantes de metales (Heim *et al.*, 2002) y de acuerdo a lo que se ha estudiado sobre estos compuestos, son capaces de prevenir el daño causado por los radicales libres mediante los siguientes mecanismos: (1) neutralización directa de las ERO (**FIGURA 3**), (2) activación de enzimas antioxidantes, (3) actividad quelante de metales, (4) reducción de radicales de  $\alpha$ -tocoferol, (5) inhibición de oxidasas, (6) mitigación del estrés oxidativo causado por óxido nítrico y (7) aumento de los niveles de ácido úrico (Procházková *et al.*, 2011).



**FIGURA 3. Neutralización de especies reactivas del oxígeno (ERO) por flavonoides. El radical libre FI-O• puede reaccionar con otro radical, adquiriendo la estructura estable de una quinona (Procházková *et al.*, 2011).**

Una importante enzima involucrada en reacciones oxido-reducción de nuestro organismo es la xantina oxidasa (XO). Esta metaloenzima, la cual corresponde una forma de xantino oxidoreductasa (XOR), es ampliamente conocida debido a su rol en el catabolismo de las purinas, mediante el cual transforma la hipoxantina y xantina en

ácido úrico. Elevados niveles de ácido úrico conducen a diversos eventos patológicos, incluyendo gota y la formación de cálculos en los riñones. Además, una elevada actividad de XO produce una importante contribución al estrés oxidativo debido a la producción de anión superóxido (Hidalgo *et al.*, 2010). Debido a su capacidad de reducir O<sub>2</sub>, esta enzima es considerada como una importante fuente de especies reactivas que participan en el daño causado en isquemia/reperfusión, por lo que es relevante encontrar diferentes estrategias para su inhibición (Cantu-Medellin y Kelley, 2013).

Se ha reportado que los flavonoides pueden ejercer su actividad antioxidante, mediante la inhibición de diversas enzimas. Como por ejemplo, han demostrado poseer un efecto inhibitorio sobre XO, siendo las flavonas y los flavonoles que poseen un grupo hidroxilo en C-7 los que presentan un mayor efecto inhibitorio sobre esta enzima (Nagao *et al.*, 1999).

En el año 2000, Seguel *et al.* demostraron que *Ugni molinae* presenta una alta variabilidad genética a través de un estudio de genotipificación, mediante la técnica de ADN polimórfico amplificado al azar (RAPD), de 100 especies silvestres recolectadas desde la VII hasta la X Región de Chile (Seguel *et al.*, 2000). Debido a esto y de acuerdo a la información expuesta anteriormente, el principal objetivo de este trabajo fue comprobar la existencia de diferencias, tanto en la capacidad antioxidante como en la composición fenólica, de los extractos etanólicos (EETs) de hojas de murtila provenientes de 10 genotipos diferentes, los cuales fueron cultivados bajo las mismas condiciones.

## **II. HIPÓTESIS**

Los extractos etanólicos obtenidos desde las hojas de *Ugni molinae* Turcz. presentan diferencias en su capacidad antioxidante debido a la influencia del genotipo sobre contenido de fenoles totales y flavonoides.

## **III. OBJETIVOS**

### **3.1. Objetivo general**

Evaluar en forma comparativa la cantidad de fenoles totales, flavonoides y la capacidad antioxidante de los extractos etanólicos (EETs) de hojas de murtila de diferentes genotipos que fueron cultivados bajo las mismas condiciones.

### **3.2. Objetivos específicos**

- Comparar la actividad antioxidante de los EETs obtenidos desde las hojas de 10 genotipos de murtila.
- Correlacionar las capacidades antioxidantes con la cantidad de fenoles totales y flavonoides de los EETs de los 10 genotipos estudiados.



## IV. MATERIALES Y MÉTODOS

### 4.1. Reactivos

CH<sub>3</sub>COOH glacial 100%, HCl 37% v/v, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O, Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, FeSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O, CH<sub>3</sub>COONa, metanol p.a y reactivo de Folin-Ciocalteu fueron adquiridos en Merck, Alemania; FeCl<sub>3</sub> (Fisher Scientific Company, USA), AlCl<sub>3</sub>·6H<sub>2</sub>O (Riedel-de Haen, Alemania), ácido gálico hidratado (Mallinckrodt); patrones de rutina hidratada, quercetina hidratada y miricitrina, además de xantina oxidasa de leche bovina (Sigma-Aldrich) y el compuesto de referencia alopurinol fueron adquiridos en Sigma-Aldrich.

Solventes de grado de laboratorio para las extracciones, agua destilada y cromatofolios de sílica gel 60 F<sub>254</sub> (Merck) para cromatografía en capa fina (CCF). El agua milli-Q fue preparada empleando un sistema Milipore Mili-Q (Milipore, Bedford, MA, USA).

## 4.2. Material vegetal

A partir de diez accesiones obtenidas desde el banco de germoplasma del Instituto de Investigaciones Agropecuarias (INIA), Carillanca, IX Región, se desarrollaron los cultivos de 10 genotipos de *Ugni molinae* en las mismas condiciones edafoclimáticas. Se recolectaron hojas de cada uno de los genotipos en el mes de mayo del 2013. Cabe mencionar que dicho banco de germoplasma cuenta con 100 accesiones colectadas en el año 1996 desde la VII y hasta la X Región del Maule hasta la Región de Los Lagos (Seguel *et al.*, 2000).

La selección de los 10 genotipos de murtila que fueron estudiados en esta memoria se realizó de acuerdo con el siguiente criterio: 5 fueron seleccionados por la calidad de sus frutos, siendo los 5 restantes seleccionados por la cantidad de hojas (**Tabla 1**). Se guardaron los testigos herbarios de los 10 genotipos en el herbario de la Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas de la Universidad de Chile. Los números de registro para cada testigo herbario son los siguientes: 8-2 (SQF 22571), 14-4 (SQF 22549), 19-1 (SQF 22554), 19-1 ha (SQF 22553), 19-2 (SQF 22557), 22-1 (SQF 22553), 23-2 (SQF 22556), 27-1 (SQF 22555), 31-1 (SQF 22551) y (ZF-18 SQF 22550). Las fotografías respectivas se encuentran en la sección de **ANEXOS (Anexo 3)**.

**Tabla 1. Procedencia y criterios de selección de los genotipos de *Ugni molinae* utilizados en este estudio**

Genotipo (n° de accesión)	Lugar de procedencia	Criterio de selección
8-2	Cauquenes, VII Región del Maule	Cantidad de hojas
14-4	Purén, IX Región de la Araucanía	Cantidad de hojas
19-1	Porma, IX Región de la Araucanía	Cantidad de hojas
19-1 ha	Porma, IX Región de la Araucanía	Cantidad de hojas
ZF-18	Putique, X Región de Los Lagos	Cantidad de hojas
19-2	Porma, IX Región de la Araucanía	Calidad de los frutos
22-1	Mehuín, XIV Región de los Ríos	Calidad de los frutos
23-2	Queule, IX Región de la Araucanía	Calidad de los frutos
27-1	Aucar, X Región de Los Lagos	Calidad de los frutos
31-1	Lenca, X Región de Los Lagos	Calidad de los frutos

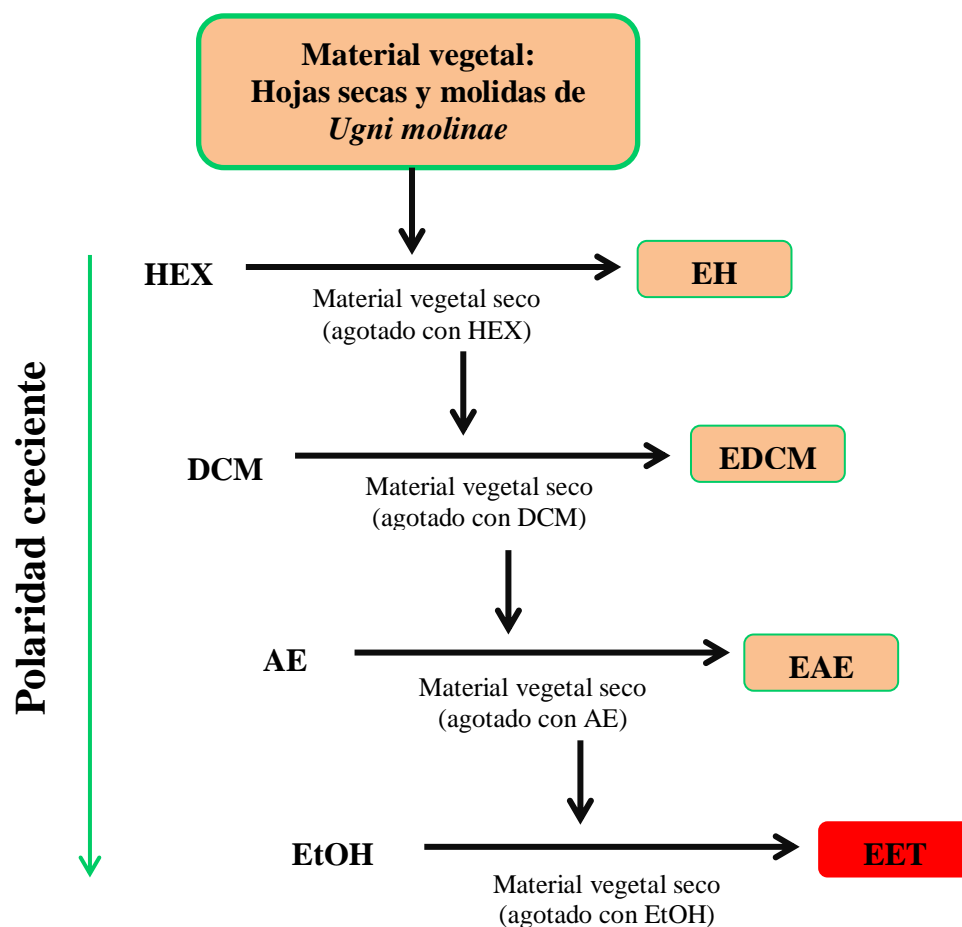
### 4.3. Estudio químico

#### 4.3.1. Preparación de los extractos etanólicos seriados de hojas de *U. molinae*

La primera etapa de la preparación fue pesar hojas secas y molidas de cada uno de los 10 genotipos, registrando los valores para posteriormente obtener los rendimientos de cada extracción. El proceso consistió en una extracción seriada con solventes de polaridad creciente (**FIGURA 4**), obteniéndose los siguientes extractos, los cuales fueron concentrados a través de un evaporador rotatorio a presión reducida: (1)

extracto hexánico (EH), (2) extracto de diclorometano (EDCM), (3) extracto de acetato de etilo (EAE) y (4) extracto etanólico (EET). Cada extracción se realizó hasta agotar completamente el material vegetal con cada disolvente, el cual fue debidamente secado antes de agregar el siguiente disolvente.

Los extractos obtenidos se llevaron a sequedad por medio de una corriente de aire caliente (30°C), luego se molieron y se almacenaron a temperatura ambiente en frascos de plástico etiquetados con el código de cada genotipo.



**FIGURA 4.** Esquema del proceso de extracción seriada de las hojas de murtila, realizado con cada uno de los 10 genotipos.

### 4.3.2. Cromatografía en capa fina (CCF)

Se realizó la técnica de CCF para evidenciar la presencia de polifenoles en los EETs de los distintos genotipos de murtilla. Se utilizaron cromatofolios de sílica gel 60 F<sub>254</sub> (Merck) y las cromatografías fueron desarrolladas con los EETs y patrones de quercetina (Q), rutina (Ru) y ácido gálico (AG), cuyas estructuras químicas se encuentran en la sección de **ANEXOS (Anexo 4)**. Se realizaron dos tipos de cromatografías, la primera optimizada para visualizar rutina y la segunda, para detectar quercetina y ácido gálico en los EETs. Las condiciones cromatográficas se presentan a continuación (**Tabla 2**).

**Tabla 2. Condiciones cromatográficas para evidenciar la presencia de polifenoles por CCF**

	Patrones	Fase móvil	Revelador
CCF 1	Rutina	1) AE:HCOOH: CH <sub>3</sub> COOH:H <sub>2</sub> O 10: 1,1: 1,1: 2,6	NP/PEG / UV 365 nm
CCF 2	Quercetina Ácido gálico	2) AE:DCM:CH <sub>3</sub> COOH:H <sub>2</sub> O 60:30:10:20	NP/PEG / UV 365 nm

### 4.3.3. Cuantificación de la composición fenólica de los EETs

Mediante la técnica de espectrofotometría, utilizando un lector de microplacas Thermo Scientific, modelo multiskan GO, se cuantificó la cantidad de fenoles totales y la cantidad de flavonoides de los 10 EETs de las hojas de *Ugni molinae*.

#### **4.3.3.1. Determinación del contenido fenólico total de los EETs de hojas de murtila mediante el ensayo de Folin-Ciocalteu**

El método original de Folin-Ciocalteu (F-C) se originó en el año 1927 a partir de los reactivos químicos utilizados para el análisis de tirosina, en donde la oxidación de los fenoles, mediante un reactivo de molibdotungstato, producía un producto coloreado con un máximo de absorbancia a 745-750 nm (Prior *et al.*, 2005). Muchos años después, Singleton y Rossi (1965) mejoraron el ensayo y lo extendieron al análisis de fenoles totales en vino; desde entonces el ensayo ha encontrado variadas aplicaciones (Huang *et al.*, 2005).

El reactivo de Folin-Ciocalteu (RF-C) está formado por una mezcla de ácido fosfotúngstico ( $H_3PW_{12}O_{40}$ ) y ácido fosfomolibdico ( $H_3PMo_{12}O_{40}$ ), la cual, a través de la oxidación de los fenoles, es reducida a óxidos azules de tungsteno ( $W_8O_{23}$ ) y molibdeno ( $Mo_8O_{23}$ ), respectivamente (Galili y Hovav, 2014). Los compuestos fenólicos reaccionan con el RF-C bajo condiciones alcalinas (ajustadas por la solución de carbonato de sodio a  $pH > 10$ ). La disociación del protón fenólico permite la formación del ión fenolato, el cual es capaz de reducir el RF-C, lo que apoya la idea de que la reacción ocurre a través del mecanismo de transferencia de electrones (Huang *et al.*, 2005). Los compuestos resultantes de color azul tienen un máximo de absorbancia en la región de los 760 nm, la cual es proporcional a la cantidad total de compuestos fenólicos presentes en la muestra (Galili y Hovav, 2014).

La metodología utilizada en este trabajo se basó la descrita en el trabajo de Cicco *et al.* (2009), la cual se modificó parcialmente (adaptando la metodología para un volumen final de los reactivos de 300  $\mu\text{L}$ ) con el fin de implementar el método en el espectrofotómetro de microplacas. Las modificaciones están descritas en el protocolo de la **Tabla 3**.

### **Preparación de reactivos**

1. Reactivo de F-C 10% (v/v): mezclar 1 mL de RF-C en 10 mL de agua destilada.
2.  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  5% (p/v): mezclar en un matraz de 100 mL 5 g de  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  y aforar con agua destilada.

### **Procedimiento**

1. Los EETs se disolvieron en metanol/agua (80% v/v) a concentraciones finales entre 30 – 50  $\mu\text{g/mL}$  (volumen final de 300  $\mu\text{L}$ ), dependiendo de la absorbancia final de la muestra, con el fin de trabajar en el rango en que se cumple la ley de Beer.
2. Se agregaron 30  $\mu\text{L}$  de los EETs y 30  $\mu\text{L}$  de RF-C al pocillo de la microplaca, se agitó y se dejó incubar por 2 min a 40°C.
3. Se agregaron 240  $\mu\text{L}$  de  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  5% (p/v), se agitó y se incubó durante 20 min a 40°C.
4. Finalmente, se leyó la absorbancia del cromógeno azul obtenido a 765 nm.

**Tabla 3. Protocolo del ensayo de Folin-Ciocalteu**

Reactivos	Muestra a analizar	Blanco
<b>EET en MeOH 80% (v/v)</b>	30 $\mu$ L	-
<b>MeOH 80% (v/v)</b>	-	30 $\mu$ L
<b>RF-C 10%</b>	30 $\mu$ L	30 $\mu$ L
	Incubar 2 min a 40°C	Incubar 2 min a 40°C
<b>Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 5% (p/v)</b>	240 $\mu$ L	240 $\mu$ L
<b>Volumen final</b>	300 $\mu$ L	300 $\mu$ L
	Incubar 20 min a 40°C	Incubar 20 min a 40°C
	Leer a $\lambda = 765$ nm	Leer a $\lambda = 765$ nm

Los ensayos se realizaron en triplicado para cada genotipo, utilizando como blanco MeOH 80% (v/v) en reemplazo de las muestras. Previamente se realizó una curva con ácido gálico (AG) como patrón (soluciones metanólicas de 2 – 10  $\mu$ g/mL), bajo las mismas condiciones descritas anteriormente. En esta curva se interpolaron las absorbancias obtenidas con cada uno de los EETs obteniendo la concentración de fenoles totales expresada en mg AG/g extracto seco (ES)  $\pm$  DS.

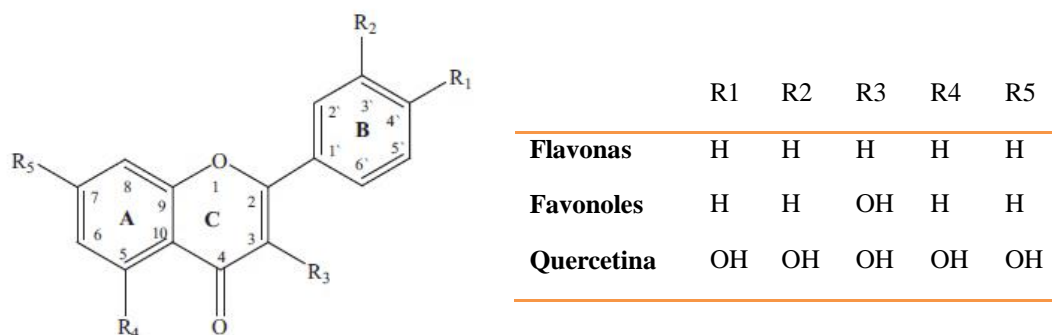
#### **4.3.3.2. Determinación del contenido de flavonas y flavonoles de los EETs de hojas de murtila con AlCl<sub>3</sub>**

El principio del método colorimétrico con AlCl<sub>3</sub> se basa en que este compuesto forma complejos estables con el grupo ceto del C-4 y los hidroxilos del C-3 de flavonoles y C-5 de flavonas (**FIGURA 5**). Además, el AlCl<sub>3</sub> forma complejos ácidos lábiles con los grupos ortodihidroxilos del anillo A o B de los flavonoides. Los



complejos formados por flavonoles con grupos hidroxilos en C-3 y C-5, como galangina, morina y canferol, al igual que los que poseen grupos orto-dihidroxilos adicionales, como rutina, quercetina y miricetina, tienen un máximo de absorbanza a 415-430 nm (Chang *et al.*, 1997).

El método utilizado para la medición de flavonas y flavonoles en los EETs de los 10 genotipos de murtilla se basó en el descrito por Chang *et al.* (1997), con algunas modificaciones que se describen en el protocolo de la **Tabla 4** (modificación de volúmenes de reactivos y cambio de solvente para completar volumen final).



**FIGURA 5. Esqueleto molecular de las flavonas y flavonoles**

### Preparación de reactivos

1. Solución de  $\text{AlCl}_3$  10% (v/v): Pesar 9 g de  $\text{AlCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  y aforar con agua destilada en un matraz de 100 mL.
2. Solución de  $\text{CH}_3\text{COONa}$  1M: Pesar 1,64 g  $\text{CH}_3\text{COONa}$  en un matraz de 20 mL y aforar con agua destilada.

## Procedimiento

1. Los EETs obtenidos de los 10 genotipos se disolvieron en MeOH a concentraciones finales de 0,2 – 0,3 mg/mL (volumen final de 300  $\mu$ L), dependiendo de la absorbancia final de la muestra, con el fin de trabajar en el rango en que se cumple la ley de Beer.
2. Se agregaron en el pocillo de la microplaca 30  $\mu$ L de EET, 10  $\mu$ L de  $\text{AlCl}_3$  10% (v/v), 10  $\mu$ L de  $\text{CH}_3\text{COONa}$  1M y 250  $\mu$ L de agua destilada.
3. Se agitó para homogeneizar y se incubó a 25°C durante 30 min
4. Finalmente, se leyó la absorbancia del producto amarillo obtenido a una longitud de onda de 415 nm.

**Tabla 4. Protocolo para en ensayo colorimétrico con  $\text{AlCl}_3$**

Reactivos	Muestra a analizar	Blanco
EET en MeOH	30 $\mu$ L	-
MeOH	-	30 $\mu$ L
$\text{AlCl}_3$ 10% (v/v)	10 $\mu$ L	10 $\mu$ L
$\text{CH}_3\text{COONa}$ 1M	10 $\mu$ L	10 $\mu$ L
Agua destilada	250 $\mu$ L	250 $\mu$ L
<b>Volumen final</b>	300 $\mu$ L	300 $\mu$ L
	Incubar 30 min a 25°C	Incubar 20 min a 25°C
	Leer a $\lambda = 415$ nm	Leer a $\lambda = 415$ nm

Los ensayos se realizaron en triplicado para cada genotipo, utilizando como blanco MeOH en reemplazo del EET. Previamente se realizó una curva de calibración utilizando quercetina como patrón (soluciones metanólicas de 4 – 14  $\mu$ g/mL), bajo las

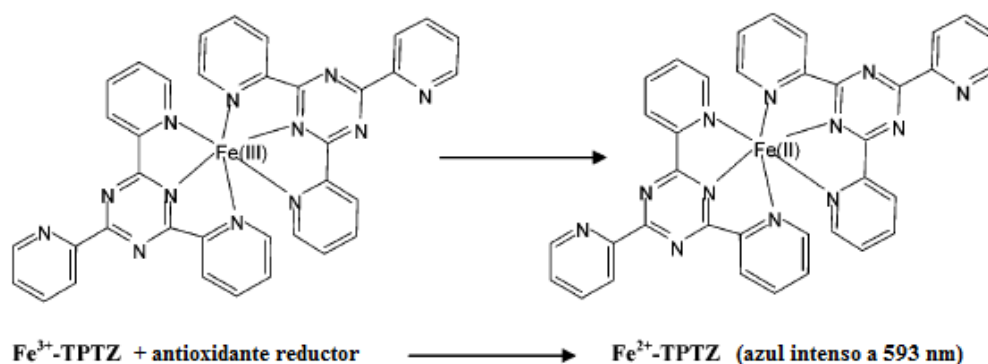
mismas condiciones descritas en la **Tabla 4**. En esta curva se interpolaron las absorbancias obtenidas por los EETs de las hojas de murtila, obteniendo la concentración de flavonas y flavonoles expresada en mg quercetina/g ES  $\pm$  DS.

Para el análisis estadístico y determinación de las diferencias significativas entre los resultados de los EETs en ambos ensayos se utilizó ANOVA de una vía y el análisis de comparaciones múltiples de Tukey. El programa utilizado para esto y para la obtención de las gráficas fue GraphPad Prism 6 y la correlación entre el contenido de fenoles totales y flavonoides fue determinada calculando el coeficiente de correlación de Pearson (r).

#### **4.4. Estudios farmacológicos *in vitro***

##### **4.4.1. Evaluación de la actividad antioxidante *in vitro* mediante el ensayo FRAP (*Ferric Reducing Antioxidant Power*)**

El ensayo FRAP fue desarrollado originalmente por Benzie y Strain (1996) para medir el poder reductor en muestras de plasma, sin embargo, también se ha adaptado y utilizado para el ensayo de antioxidantes en productos botánicos (Prior *et al.*, 2005). La reacción mide la reducción del complejo férrico-2,4,6,tripiridil-s-triazina (TPTZ), en la cual el hierro férrico ( $\text{Fe}^{3+}$  - TPTZ) se reduce a ión ferroso a bajo pH, causando la formación de un complejo ferroso-tripiridil-triazina coloreado ( $\text{Fe}^{2+}$  - TPTZ), que absorbe a una longitud de onda de 593 nm (Benzie y Strain, 1996).



**FIGURA 6. Reacción involucrada en el ensayo FRAP** (Prior *et al.*, 2005)

Este ensayo considera la actividad antioxidante de una muestra como una medida de su capacidad reductora del  $\text{Fe}^{3+}$ . El método utilizado se basó en el procedimiento descrito por Benzie y Strain (1996), con algunas modificaciones para adaptar la metodología al espectrofotómetro de microplacas de 96 pocillos Thermo Scientific, modelo multiskan GO. Dichas modificaciones (adaptación de volúmenes finales de los reactivos para un volumen final de 300  $\mu\text{L}$ ) están descritas en protocolo de la **Tabla 5**.

Los patrones que se utilizaron para comparar los resultados obtenidos fueron trolox, quercetina y miricitrina, y sus estructuras químicas se encuentran en la sección de **ANEXOS (Anexo 4)**.

## Preparación de reactivos

1. Tampón pH 3,6: mezclar 1,64 g de  $\text{CH}_3\text{COONa}$  con 16 mL de  $\text{CH}_3\text{COOH}$  glacial para 1 litro de solución (completar volumen con agua destilada).
2. Solución TPTZ 10 mM (2,4,6-tripiridil-s-triazina): pesar 0,031 g en un matraz de 10 mL y aforar con HCl diluido (40 mM). Es importante preparar esta solución el mismo día que se va a utilizar.
3. Solución  $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  20 mM: pesar 0,054 g de  $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  en un matraz de 10 mL y aforar con agua destilada.
4. Reactivo FRAP: Mezclar 1020  $\mu\text{L}$  de solución tampón pH 3,6, 100  $\mu\text{L}$  de TPTZ 10 mM y 100  $\mu\text{L}$  de  $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  20 mM.

## Procedimiento

1. Los EETs de las hojas de murtila se disolvieron en MeOH a concentraciones finales de 7,0-8,0  $\mu\text{g}/\text{mL}$  (en un volumen final de 300  $\mu\text{L}$ ), dependiendo de la absorbancia final de la muestra, con el fin de trabajar en el rango en que se cumple la ley de Beer.
2. Se agregaron 10  $\mu\text{L}$  del EET en MeOH al pocillo de la microplaca y 290  $\mu\text{L}$  de reactivo FRAP recién preparado.
3. Se agitó y se programó el equipo para realizar 300 lecturas de absorbancia durante 1 hora continua (300 lecturas cada 12 segundos), a una temperatura de 37°C. Las lecturas se midieron a una longitud de onda de 593 nm.

4. Finalmente, se obtuvo la curva del ensayo FRAP para cada medición y se compararon los valores obtenidos a los 4, 30 y 60 min.

**Tabla 5. Protocolo para el ensayo FRAP**

Reactivos	Muestra a analizar	Blanco
EET en MeOH	10 µL	-
MeOH	-	10 µL
Reactivo FRAP	290 µL	290 µL
Volumen final	300 µL	300 µL
	Bucle cinético: 300 lecturas durante 1 hora a 37°C Leer a $\lambda = 593$ nm	Bucle cinético: 300 lecturas durante 1 hora a 37°C Leer a $\lambda = 593$ nm

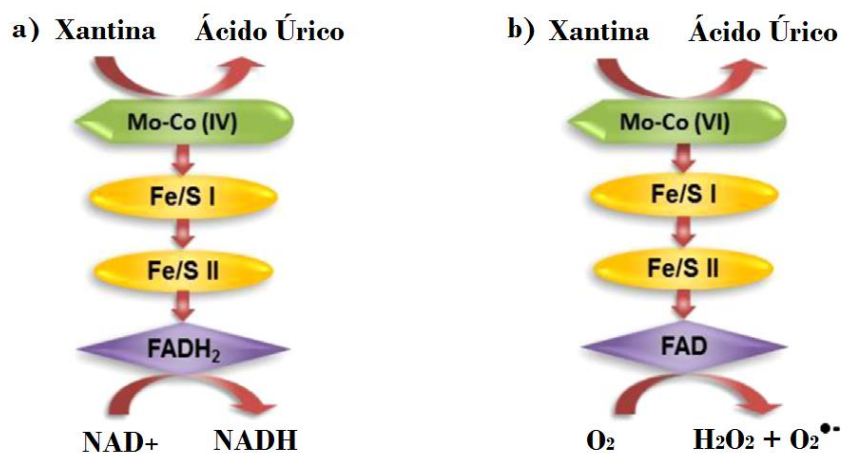
El ensayo se realizó en triplicado para cada genotipo, utilizando como blanco MeOH en reemplazo de la muestra. Previamente se realizó una curva de calibración, con la cual se implementó el método en el espectrofotómetro de microplacas, utilizando como patrón  $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  (soluciones acuosas de 10 – 40 µmol/L), bajo las mismas condiciones descritas en la **Tabla 5**. En esta curva se interpolaron las absorbancias obtenidas por los EETs de las hojas de murtila, obteniendo el valor FRAP para los distintos tiempos expresado en  $\text{mmol Fe}^{2+}/\text{g ES} \pm \text{DS}$ .

Para el tratamiento de datos se utilizó el programa GraphPad Prism 6. El análisis estadístico y determinación de las diferencias significativas entre los resultados de los EETs se utilizó ANOVA de una vía y el análisis de comparaciones múltiples de Tukey. La correlación entre la actividad antioxidante, el contenido fenólico total y el contenido de flavonoides fue determinada calculando el coeficiente de correlación de Pearson (r).

#### **4.4.2. Ensayo de inhibición de la enzima xantina oxidasa (XO)**

Xantina oxidoreductasa (XOR) es una enzima molibdo-flavina que cataliza las dos reacciones terminales de la degradación de las purinas: oxidación de hipoxantina a xantina y la subsecuente oxidación de xantina a ácido úrico. Esta enzima es un homodímero de aproximadamente 300 kD, donde cada subunidad consiste en cuatro centros redox: a) un cofactor molibdeno, donde se oxidan las purinas, b) un sitio FAD, donde ocurre la reducción de  $\text{NAD}^+$  y de  $\text{O}_2$ , y c) dos grupos Fe/S. XOR se expresa en la forma de xantina deshidrogenasa (XDH), en la cual con se reduce  $\text{NAD}^+$  a NADH, sin embargo, durante procesos inflamatorios y en isquemia/reperfusión, la oxidación de residuos de los residuos de cisteína (535 y 992) y/o la proteólisis convierte la XDH en XO (Cantu-Medellin y Kelley, 2013).

En la forma oxidasa de XOR, aumenta considerablemente la afinidad por el oxígeno ( $\text{O}_2$ ) en el sitio FAD de la enzima y disminuye por el aceptor de electrones  $\text{NAD}^+$ , resultando en una transferencia univalente y divalente de electrones al  $\text{O}_2$ , generando anión superóxido ( $\text{O}_2^-$ ) y peróxido de hidrógeno ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ). Debido a su capacidad de reducir  $\text{O}_2$ , esta enzima es considerada como una importante fuente de especies reactivas que participan en el daño causado en isquemia/reperfusión (Cantu-Medellin y Kelley, 2013).



**FIGURA 7.** a) Oxidación de xantina a ácido úrico catalizada por XDH, donde NAD<sup>+</sup> es reducido a NADH. b) Oxidación de xantina a ácido úrico catalizada por XO, donde el oxígeno molecular es reducido a O<sub>2</sub><sup>-</sup> y H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (Cantu-Medellin y Kelley, 2013).

La inhibición de la XO resulta en una disminución en la producción de ácido úrico, lo que puede ser medido espectrofotométricamente a 290 nm (Cos *et al.*, 1998, Nagao *et al.*, 1999). La metodología utilizada se basó en la descrita por Umamaheswari *et al.* (2009) y para la medición de la formación de ácido úrico se utilizó un espectrofotómetro UNICAM UV-VIS . El protocolo del ensayo se detalla en la **Tabla 6**.

El compuesto de referencia utilizado como control positivo del ensayo fue alopurinol, con el cual se realizó la curva de inhibición de la enzima XO utilizando concentraciones entre 0,15 y 15 µg/mL. La CI<sub>50</sub> del alopurinol se obtuvo interpolando en la curva de inhibición a través del programa GraphPad Prism 6.

El alopurinol es un fármaco que se comporta como sustrato y, a la vez, como inhibidor competitivo de la XO, siendo un inhibidor no competitivo a concentraciones



altas. Al ser sustrato, el alopurinol es oxidado en oxipurinol, que también tiene capacidad de inhibir la enzima, de manera no competitiva. El resultado final se debe a la acción conjunta de ambos productos, los que reducen la formación de ácido úrico y su concentración en tejidos, plasma y orina (Flórez, 1997).

### **Procedimiento**

1. Los EETs de las hojas de murtila de los distintos genotipos se disolvieron en DMSO y se realizaron diluciones con agua Milli-Q con el fin de obtener una concentración final máxima de DMSO del 1% (v/v).
2. Los EETs se probaron inicialmente a una concentración final de 50 µg/mL, sin embargo, a esta concentración se producía interferencia en la absorbancia del ácido úrico por lo que la concentración final que se utilizó fue de 20µg/ml
3. Se mezcló en un tubo de ensayo 1 mL de muestra (EET), 2,9 ml de tampón fosfato pH 7,5 y 0,1 mL de solución de xantina oxidasa (0,01 U/mL en tampón fosfato), la cual se preparó el mismo día en que se realizó el ensayo.
4. Luego de preincubar a 25°C durante 15 min, la reacción se inició al agregar 2 mL de solución del sustrato (xantina 0,15 mM en tampón fosfato).
5. La mezcla se incubó en un baño termorregulado a 25°C durante 30 min.
6. Finalmente, la reacción se detuvo mediante la adición de 1mL de HCl 1N y se midió la absorbancia a  $\lambda = 290$  nm.

**Tabla 6. Protocolo para el ensayo de inhibición de xantina oxidasa**

Reactivos	Tubos			
	A	B	C	D
Muestra (EET)	-	-	1 mL	1 mL
Agua Milli-Q	1 mL	1 mL	-	-
Tampón pH 7,5	2,9 mL	3 mL	2,9 mL	3 mL
Xantina Oxidasa	0,1 mL	-	0,1 mL	-
<b>Preincubar a 25 ° C por 15 minutos</b>				
Xantina 0,15 mM	2 mL	2 mL	2 mL	2 mL
<b>Incubar a 25 ° C por 30 minutos</b>				
HCl 1N	1 mL	1 mL	1 mL	1 mL
Volumen final	7 mL	7 mL	7mL	7mL
<b>Leer a <math>\lambda= 290</math> nm.</b>				

Las muestras se evaluaron en triplicado y la inhibición de XO se expresó en porcentaje de inhibición de ácido úrico, el cual se calculó según la fórmula:

$$\text{Porcentaje de inhibición: } \left[ \frac{(A - B) - (C - D)}{(A - B)} \right] \times 100$$

Donde A corresponde al control enzimático (enzima sin EET), B es el blanco de A sin EET ni enzima; C corresponde a la actividad enzimática con EET y D es el blanco de C con EET y sin XO. Los valores de la  $CI_{50}$  se calcularon interpolando en la curva porcentaje de inhibición vs concentración de la muestra.

## RESULTADOS Y DISCUSIONES

### 5.1. Estudio químico

#### 5.1.1. Rendimientos de EETs de hojas de *Ugni molinae*

Los rendimientos obtenidos para los diferentes extractos de hojas de murtila (EH, EDCM, EAE y EET), una vez que estuvieron secos y pesados, se presentan en la siguiente tabla.

**Tabla 7. Rendimientos de los extractos obtenidos para cada genotipo de *U. molinae* expresados en % p/p**

	8-2	14-4	19-1	19-1 ha	19-2	22-1	23-2	27-1	31-1	ZF-18
<b>EH</b>	1,1	1,4	1,1	1,1	1,3	1,1	1,2	1,1	1,5	1,1
<b>EDCM</b>	1,3	1,9	1,5	3,0	1,9	1,6	1,3	1,7	1,7	1,7
<b>EAE</b>	5,6	5,2	5,7	4,5	4,7	5,2	7,0	4,8	5,1	3,1
<b>EET</b>	9,5	11,3	16,4	14,8	10,2	13,0	12,1	12,5	8,5	27,7

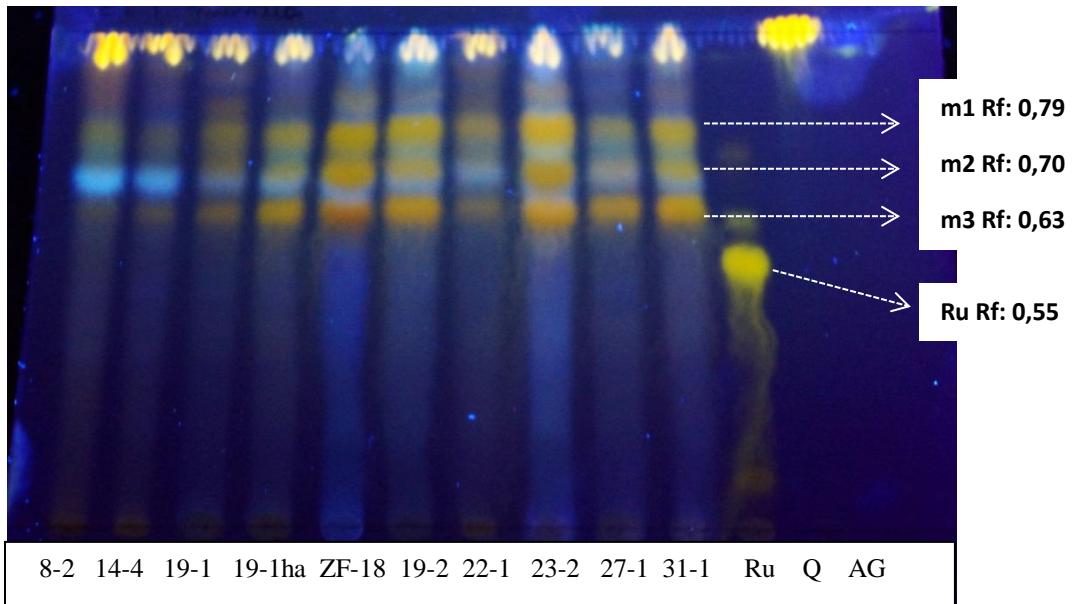
**EH: extracto hexánico; EDCM: extracto de diclorometano; EAE: extracto de acetato de etilo; EET: extracto etanólico.**

Como se observa en la **Tabla 7**, los extractos seriados de hojas de murta que obtuvieron los mayores rendimientos fueron los EETs, los cuales concentran la mayor cantidad de compuestos polares.

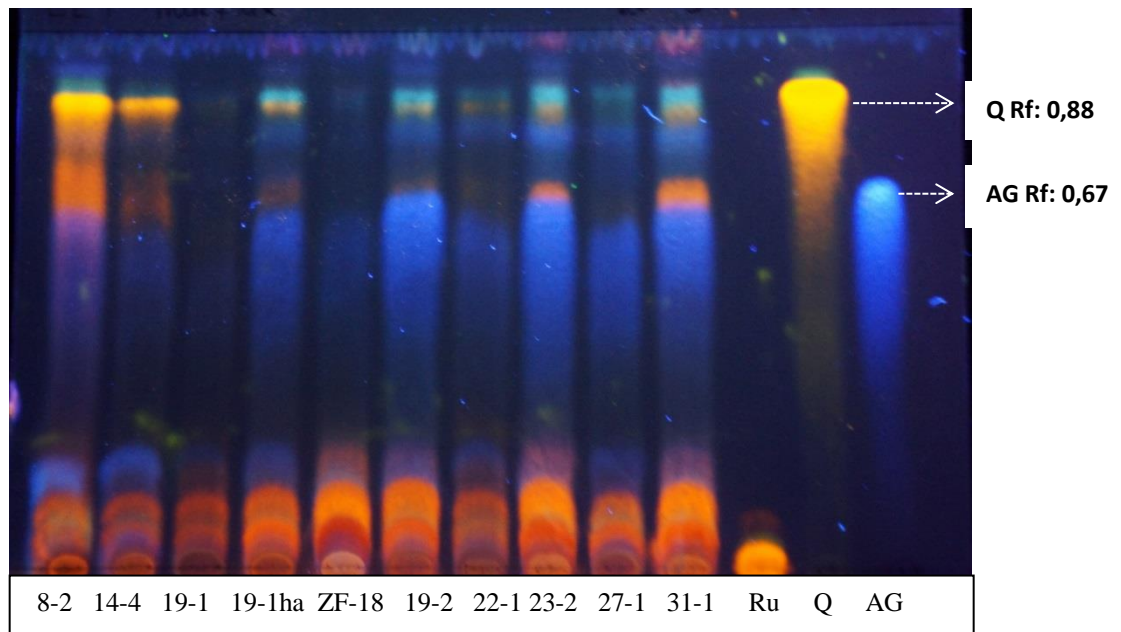
### **5.1.2. Resultados del estudio cromatográfico mediante CCF de los EETs de cada genotipo**

En el cromatograma de la **FIGURA 8** se puede observar que hay manchas anaranjadas que se repiten en todos los EETs (m1, m2 y m3), del mismo color que la rutina (Rf: 0,55) pero con un Rf más alto. Las manchas que se repiten en los EETs de cada genotipo contiene(n) compuestos de mayor polaridad (cuyos Rf va desde 0,69 y hasta 0,73) que los patrones de quercetina y ácido gálico los que quedaron en el frente del solvente. Al utilizar una fase móvil de menor polaridad (**FIGURA 9**), se pueden observar claramente las manchas correspondientes a los patrones de quercetina (Rf: 0,88) y ácido gálico (Rf: 0,67) quedando los compuestos más polares retenidos en la base del cromatofolio junto al patrón de rutina.

En la segunda CCF (**FIGURA 9**), se observa una mancha anaranjada con Rf: 0,88 en los EETs pertenecientes a los genotipos 8-2 y 14-4, la cual indicaría la probable presencia de quercetina. En los genotipos 19-1 ha, 19-2, 22-1, 23-2 y 31-1 esta mancha se visualiza con menor claridad, por lo que no es posible asegurar la presencia de quercetina en ellos. Por otro lado, a excepción del genotipo 19-1, se observa en todos los EETs una mancha de color azul con Rf: 0,67 lo que indicaría la presencia de ácido gálico.



**FIGURA 8.** CCF 1 de los EETs de los distintos genotipos de murtilla. Ru: patrón de rutina, Q: patrón de quercetina, AG: patrón de ácido gálico. Fase móvil: AE: HCOOH:CH<sub>3</sub>COOH:H<sub>2</sub>O=10: 1,1: 1,1: 2 y revelador NP/PEG (UV 365 nm).

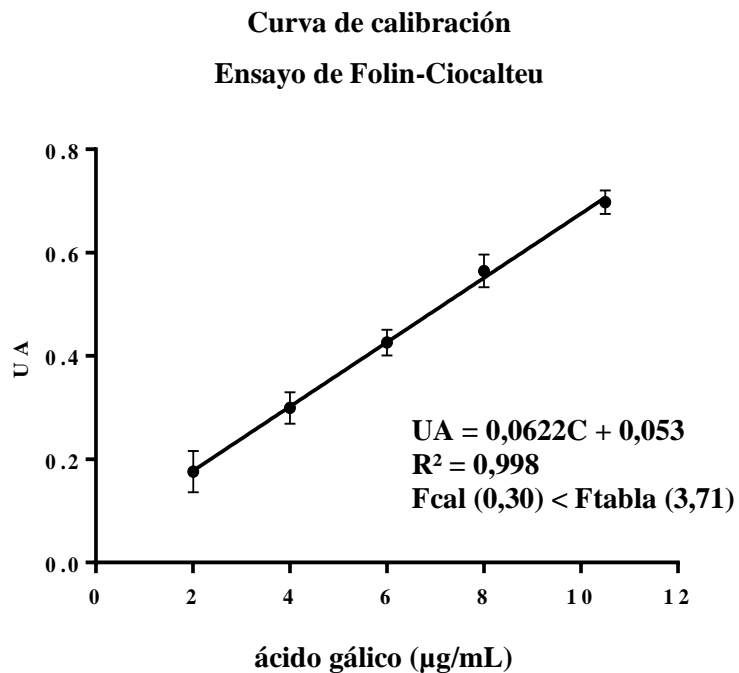


**FIGURA 9.** CCF 2 de los EETs de los distintos genotipos de murtilla. Ru: patrón de rutina, Q: patrón de quercetina, AG: patrón de ácido gálico. Fase móvil: AE:DCM:CH<sub>3</sub>COOH:H<sub>2</sub>O=60:30:10:20 y revelador NP/PEG (UV 365 nm).

### 5.1.3. Cuantificación de la composición fenólica de los EETs

#### 5.1.3.1. Determinación del contenido fenólico total mediante el ensayo de Folin-Ciocalteu

A continuación se presenta la curva de calibración utilizada para el cálculo de la cantidad de fenoles totales de los EETs de las hojas de cada genotipo de *U. molinae*. Esta curva se realizó con ácido gálico (AG) como patrón (2 – 10 µg/ml) y con ella se implementó el método en el espectrofotómetro de microplacas.



**FIGURA 10.** Curva de calibración para el ensayo de Folin-Ciocalteu con ácido gálico como patrón.

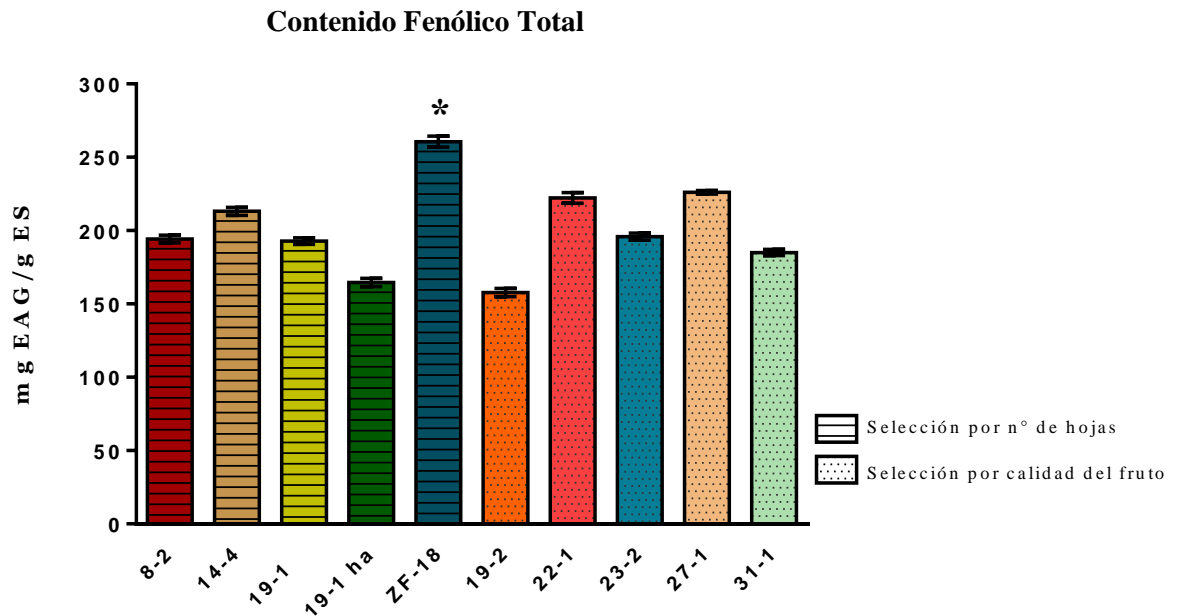
Los resultados del ensayo de F-C demuestran que existen diferencias significativas ( $p < 0,05$ ) en el contenido fenólico de algunos de los EETs de hojas de murtilla, cuyos valores fluctuaron entre un  $15,8 \pm 0,3$  y un  $26,1 \pm 0,4$  % p/p.

A continuación se presenta la **Tabla 8**, que resume los resultados obtenidos para los EETs de los 10 genotipos y un gráfico comparativo (**FIGURA 11**). Los valores se presentan como mg AG/ g ES  $\pm$  SD.

**Tabla 8. Contenido de fenoles totales de los EETs de hojas de 10 genotipos de *U. molinae***

Genotipo EET	Cantidad de Fenoles Totales (mg EAG/ g ES $\pm$ DS)*	% Fenoles Totales por g/ES
8-2	194,2 $\pm$ 2,7	19,4 $\pm$ 0,3
14-4	213,1 $\pm$ 2,7	21,3 $\pm$ 0,3
19-1	192,9 $\pm$ 2,2	19,3 $\pm$ 0,2
19-1 ha	164,6 $\pm$ 2,9	16,5 $\pm$ 0,3
ZF-18	260,6 $\pm$ 3,7	26,1 $\pm$ 0,4
19-2	157,8 $\pm$ 2,9	15,8 $\pm$ 0,3
22-1	222,3 $\pm$ 3,6	22,2 $\pm$ 0,4
23-2	195,9 $\pm$ 2,7	19,4 $\pm$ 0,3
27-1	226,1 $\pm$ 1,3	22,6 $\pm$ 0,1
31-1	185,1 $\pm$ 2,2	18,5 $\pm$ 0,2

\*Contenido fenólico total promedio (de 3 determinaciones) expresado en mg equivalentes de ácido gálico (EAG)/ g de extracto seco (ES)  $\pm$  DS



**FIGURA 11.** Gráfica de la cantidad de fenoles totales obtenidos para los EETs de los 10 genotipos de hojas de *U. molinae* estudiados. (\*) Indica el mayor valor obtenido y que presenta diferencias significativas ( $p < 0,05$ ) en relación a las otras muestras (EETs), calculado con ANOVA de una vía y test de comparaciones múltiples de Tukey

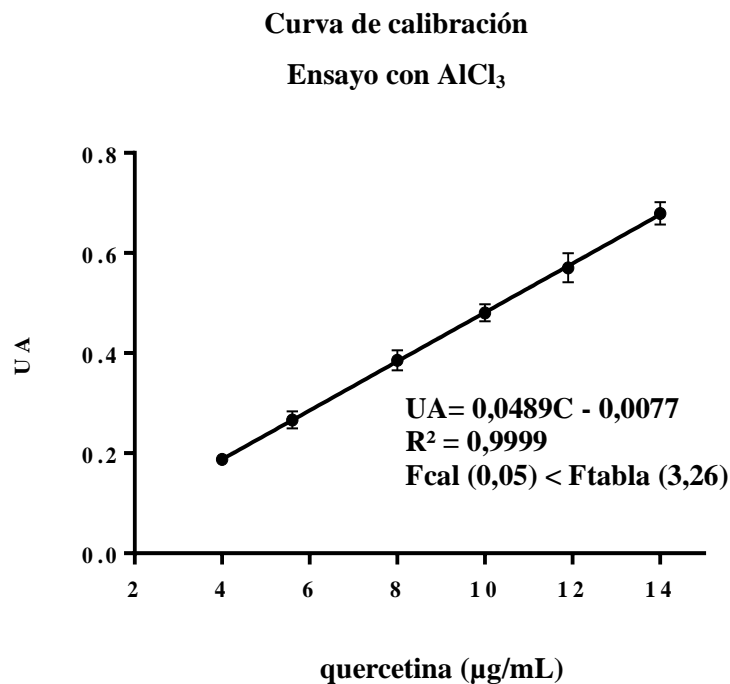
Como se muestra en la **FIGURA 11**, el EET que obtuvo la mayor cantidad de fenoles totales fue el correspondiente al genotipo ZF-18 ( $260,6 \pm 3,7$ ) siendo diferente estadísticamente ( $p < 0,05$ ) a los otros 9 genotipos. El resto de los EET que obtuvieron porcentajes altos de CFT fueron los correspondientes a los genotipos 22-1 y 27-1, en los cuales no hay significancia en la diferencia de sus valores. Los genotipos que presentaron menor CFT fueron el 19-1 ha y el 19-2, los que tienen aproximadamente un 40% menos de fenoles totales que el genotipo ZF-18. En la sección de ANEXOS se encuentra la información de las diferencias significativas del CFT entre todos los EETs (**Anexo 1A**).



### 5.1.3.2. Determinación del contenido de flavonas y flavonoles mediante la reacción con $\text{AlCl}_3$ .

La implementación de este ensayo colorimétrico nos permitió determinar el contenido de flavonas y flavonoles de los EETs. Con este objetivo se construyó una curva de calibración, en este caso, utilizando quercetina como patrón. Las concentraciones utilizadas de patrón, entre las cuales se obtuvieron unidades de absorbancias (UA) entre 0,2 y 0,7, fueron de 4-14  $\mu\text{g/mL}$ .

A continuación se presenta la curva de calibración obtenida para el ensayo con  $\text{AlCl}_3$ , para determinar la concentración de flavonas y flavonoles de los EETs de los 10 genotipos de murtila.



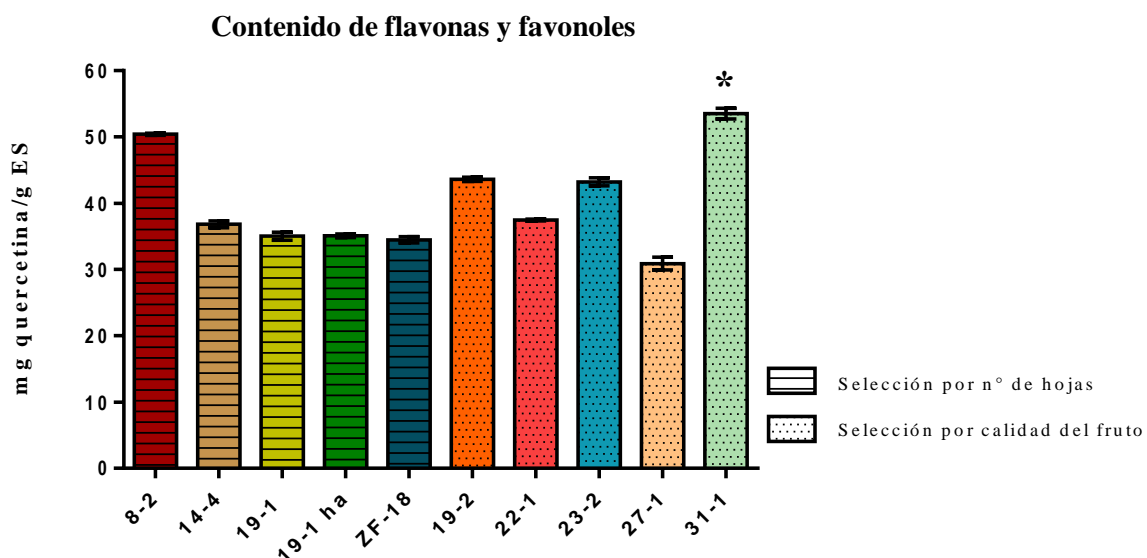
**FIGURA 12. Curva de calibración para el ensayo colorimétrico con  $\text{AlCl}_3$ , utilizando quercetina como patrón.**

Al analizar los resultados con ANOVA de una vía y el test de comparaciones múltiples de Tukey, se encontraron diferencias significativas ( $p < 0,05$ ) entre el contenido de flavonas y flavonoles de los EETs estudiados. Los resultados se expresan como mg quercetina/g ES  $\pm$  SD y se muestran en la siguiente tabla y gráfica comparativa.

**Tabla 9. Cantidad de flavonas y flavonoles de los EETs de las hojas de 10 genotipos de *U. molinae***

<b>Genotipo EET</b>	<b>Cantidad de Flavonas y Flavonoles (mg quercetina/ g ES <math>\pm</math> SD)*</b>	<b>% Flavonas y Flavonoles por g de ES</b>
<b>8-2</b>	50,4 $\pm$ 0,2	5,04 $\pm$ 0,02
<b>14-4</b>	36,8 $\pm$ 0,5	3,68 $\pm$ 0,05
<b>19-1</b>	35,1 $\pm$ 0,6	3,50 $\pm$ 0,06
<b>19-1 ha</b>	35,1 $\pm$ 0,3	3,51 $\pm$ 0,03
<b>ZF-18</b>	34,5 $\pm$ 0,5	3,45 $\pm$ 0,05
<b>19-2</b>	43,6 $\pm$ 0,3	4,36 $\pm$ 0,03
<b>22-1</b>	37,5 $\pm$ 0,1	3,75 $\pm$ 0,01
<b>23-2</b>	43,2 $\pm$ 0,6	4,32 $\pm$ 0,06
<b>27-1</b>	30,9 $\pm$ 0,9	3,09 $\pm$ 0,10
<b>31-1</b>	53,5 $\pm$ 0,8	5,35 $\pm$ 0,08

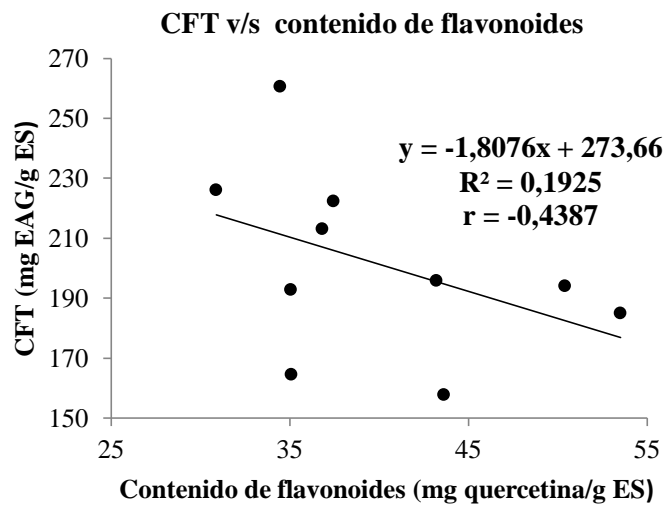
\*Contenido de flavonas y flavonoles promedio (de 3 determinaciones) expresado en mg de quercetina/g de extracto seco (ES)  $\pm$  DS



**FIGURA 13.** Cantidad de flavonas y flavonoles obtenidos para los EET de los 10 genotipos hojas de *U. molinae* estudiados. (\*) Indica el mayor valor obtenido y que presenta diferencias significativas ( $p < 0,05$ ) en relación a las otras muestras (EETs), calculado con ANOVA de una vía y test de comparaciones múltiples de Tukey.

Los EETs correspondientes a los genotipos 8-2 y 31-1 fueron los que presentaron la mayor cantidad de flavonas y flavonoles ( $50,4 \pm 0,2$  y  $53,5 \pm 0,8$  mg quercetina/g ES, respectivamente), siendo el valor del EET del genotipo 31-1 significativamente diferente ( $p < 0,05$ ) al resto de los EETs evaluados. El genotipo que obtuvo la menor concentración de flavonoides fue el 27-1 ( $30,9 \pm 0,9$  mg quercetina/g ES), el cual posee aproximadamente un 40% menos de flavonas y flavonoles que el EET del genotipo 31-1. En la sección de **ANEXOS** se encuentra la información de las diferencias significativas entre la cantidad de flavonoides de los 10 EETs analizados (**Anexo 1B**).

Al comparar los resultados obtenidos por el ensayo de F-C y por el ensayo con  $\text{AlCl}_3$ , no se encontró correlación lineal ( $r = -0,4387$ ) entre la cantidad de fenoles totales y la cantidad de flavonoides (**FIGURA 14**), siendo genotipos distintos los que presentaron mayores y menores valores en ambos estudios.

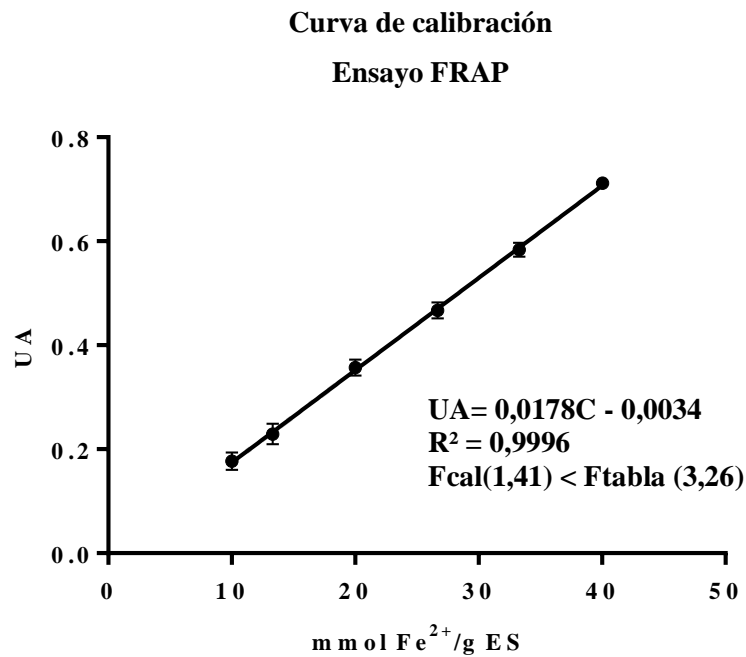


**FIGURA 14.** Correlación entre el CFT y el contenido de flavonoides de los 10 EETs de hojas de murtila

## 5.2. Estudios farmacológicos *in vitro*

### 5.2.1. Evaluación de la actividad antioxidante *in vitro* mediante el ensayo FRAP

Como se explicó anteriormente, este ensayo se implementó con el fin de evaluar la capacidad que posee una muestra para reducir  $\text{Fe}^{3+}$  a  $\text{Fe}^{2+}$  *in vitro*. A continuación se presenta la curva de calibración obtenida para el ensayo FRAP, para determinar el valor FRAP de los EETs de los 10 genotipos de murtila.



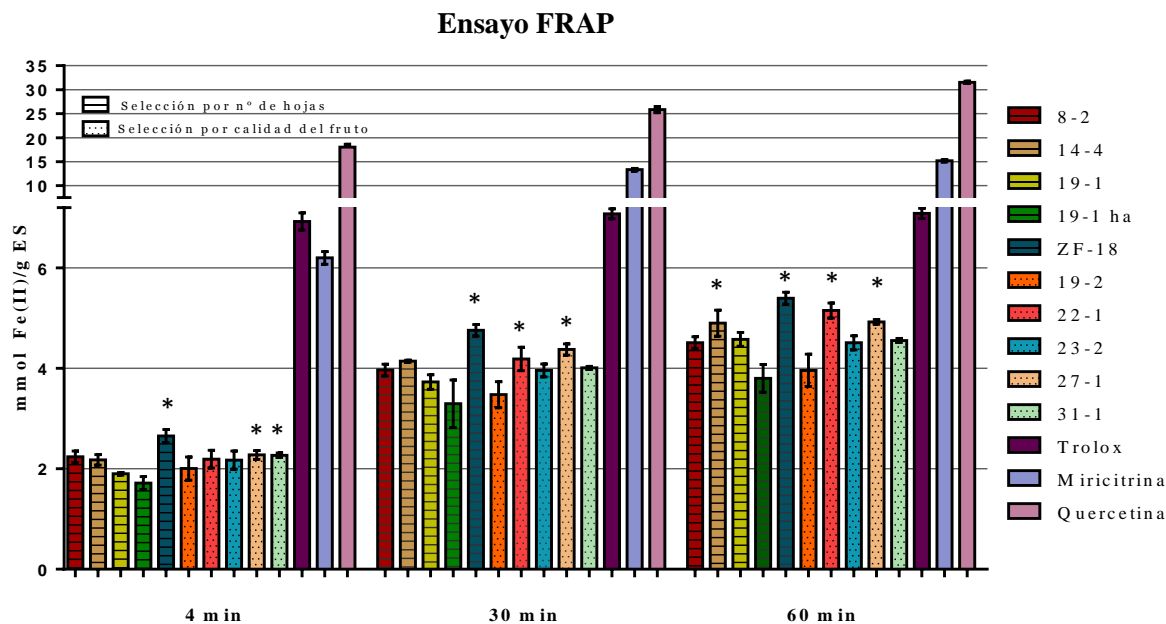
**FIGURA 15. Curva de calibración del ensayo FRAP, utilizando  $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  para determinar los valores FRAP**

Todos los EETs estudiados presentaron resultados positivos, siendo capaces de reducir el complejo Fe<sup>3+</sup>-TPTZ a los distintos tiempos evaluados (4, 30 y 60 minutos). A continuación se presenta una tabla y una gráfica de los resultados obtenidos para los 10 EETs de las hojas de murtila analizadas.

**Tabla 10. Valor FRAP (mmol Fe<sup>2+</sup>/g ES ± SD) de los EETs de hojas de *U. molinae***

Genotipo EET	Valor FRAP a 4 min	Valor FRAP a 30 min	Valor FRAP a 60 min
<b>8-2</b>	2,24 ± 0,11	3,96 ± 0,11	4,51 ± 0,12
<b>14-4</b>	2,18 ± 0,10	4,14 ± 0,03	4,90 ± 0,26
<b>19-1</b>	1,90 ± 0,02	3,73 ± 0,14	4,58 ± 0,14
<b>19-1 ha</b>	1,72 ± 0,13	3,30 ± 0,47	3,80 ± 0,28
<b>ZF-18</b>	2,65 ± 0,13	4,76 ± 0,11	5,40 ± 0,12
<b>19-2</b>	2,01 ± 0,23	3,48 ± 0,26	3,96 ± 0,32
<b>22-1</b>	2,19 ± 0,18	4,19 ± 0,24	5,15 ± 0,15
<b>23-2</b>	2,17 ± 0,18	3,96 ± 0,13	4,51 ± 0,14
<b>27-1</b>	2,28 ± 0,09	4,39 ± 0,12	4,93 ± 0,05
<b>31-1</b>	2,27 ± 0,05	4,01 ± 0,03	4,56 ± 0,04
<b>Patrones</b>			
<b>Quercetina</b>	18,05 ± 0,43	25,87 ± 0,50	31,54 ± 0,24
<b>Miricitrina</b>	6,20 ± 0,13	13,33 ± 0,11	15,20 ± 0,11
<b>Trolox</b>	6,93 ± 0,17	7,08 ± 0,10	7,09 ± 0,10

En la sección de ANEXOS, se encuentran las tablas que resumen la información de las diferencias significativas (p>0,05) entre los valores FRAP de los distintos EETs, para cada tiempo (**Anexos 1C, 1D y 1E**).



**FIGURA 16.** Valores FRAP obtenidos a los 4, 30 y 60 minutos de los EETs de hojas de *U. molinae* de los 10 genotipos estudiados, expresados en mmol Fe<sup>2+</sup>/g ES. (\*) Indica mayores valores obtenidos y que no presentan diferencias significativas ( $p > 0,05$ ) entre ellos en un mismo tiempo de medición, calculado con ANOVA de una vía y test de comparaciones múltiples de Tukey.

Como se observa en la **Tabla 10** y en la **FIGURA 16** existen diferencias significativas ( $p < 0,05$ ) en el valor FRAP de los EETs analizados, especialmente en la medición realizada a los 60 minutos.

Los EETs obtenidos desde las hojas de los genotipos ZF-18 y 27-1 obtuvieron los mayores valores FRAP a los distintos tiempos de medición y con un valor cercano al de patrón de trolox a los 60 min ( $5,40 \pm 0,12$  y  $4,93 \pm 0,05$  mmol Fe<sup>2+</sup>/g ES, respectivamente). Por otro lado, el genotipo que obtuvo la menor capacidad reductora sobre Fe<sup>3+</sup> fue el 19-1 ha, siendo sus valores FRAP los más bajos en los diferentes tiempos de medición.

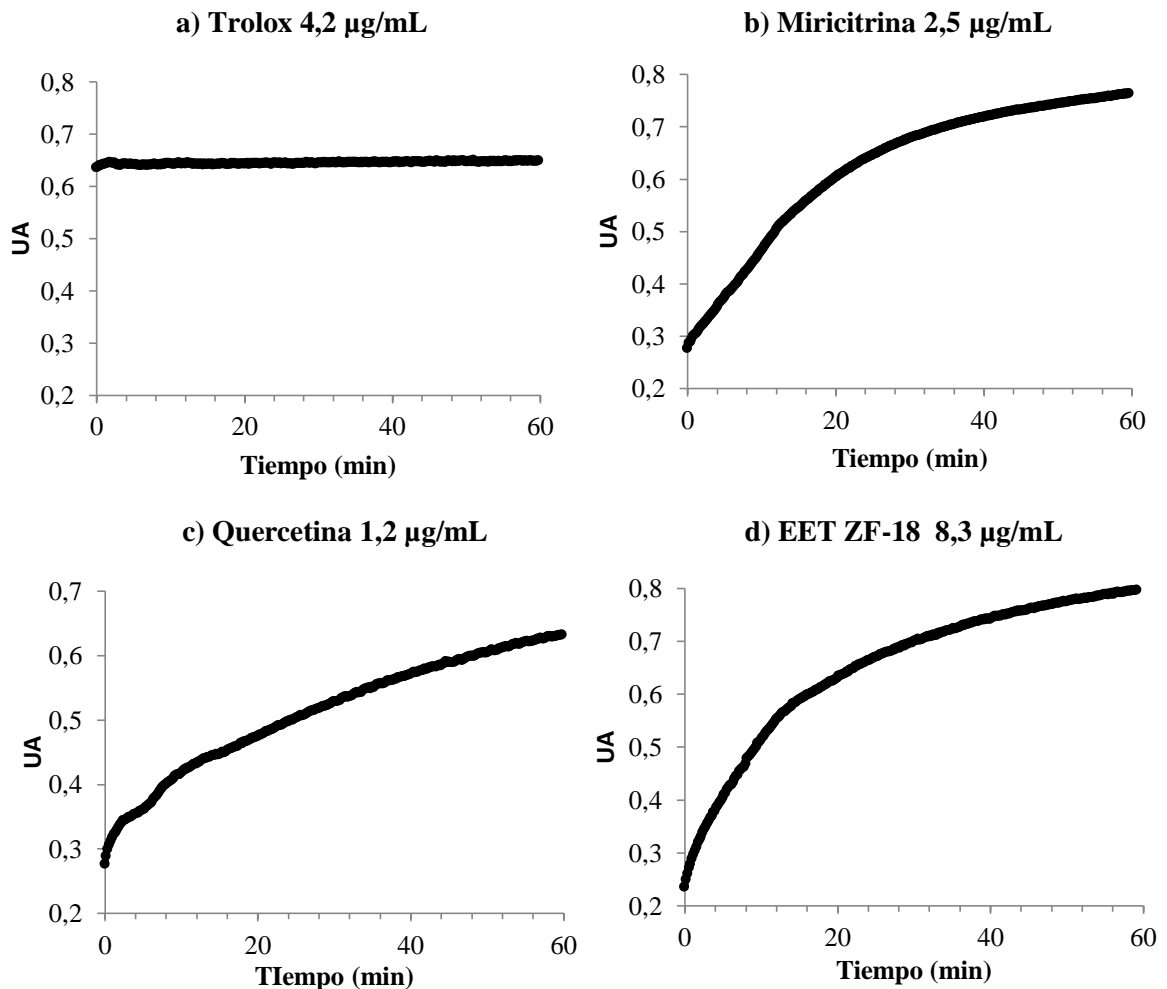
Entre los diferentes EETs, cabe destacar el comportamiento reductor de los genotipos 14-4 y 22-1, cuyos valores FRAP no se destacan al comienzo de la reacción, pero a medida que transcurre el tiempo, logran diferenciarse y alcanzar unos de los valores más altos al final del ensayo.

Al comparar con los patrones, los EETs analizados obtuvieron valores inferiores que estos flavonoides. La quercetina alcanza un valor FRAP aproximadamente 6 veces mayor al valor obtenido por los EETs a los 60 minutos y es aproximadamente el doble del valor FRAP obtenido por el patrón de miricitrina. La diferencia estructural entre estos dos compuestos es que la miricitrina posee el 3-OH sustituido por una ramnosa y un OH adicional en el anillo B (pirogalol).

Respecto a la relación estructura-actividad antioxidante, la capacidad neutralizadora de radicales libres de los flavonoides depende de los OH en el anillo B y también de la presencia de un grupo 3-OH libre. A este grupo se le atribuye, en parte, la superioridad que posee la quercetina de inhibir el daño oxidativo inducido tanto por metales como por no metales, ya que se postula que aumenta la estabilidad del radical flavonoide (Heim *et al.*, 2002).



A continuación se presentan las curvas de cinética del ensayo FRAP, que representan el avance de la reacción de reducción de  $\text{Fe}^{3+}$  a  $\text{Fe}^{2+}$ , obtenidas por los patrones estudiados, y la curva del EET que obtuvo el mayor valor FRAP a los distintos tiempos (ZF-18). Las gráficas de los demás genotipos de murtila se encuentran en la sección de ANEXOS (Anexo 2).



**FIGURA 17.** Curvas de cinética FRAP de los patrones de a) trolox, b) miricitrina, c) quercetina y d) EET del genotipo ZF-18.

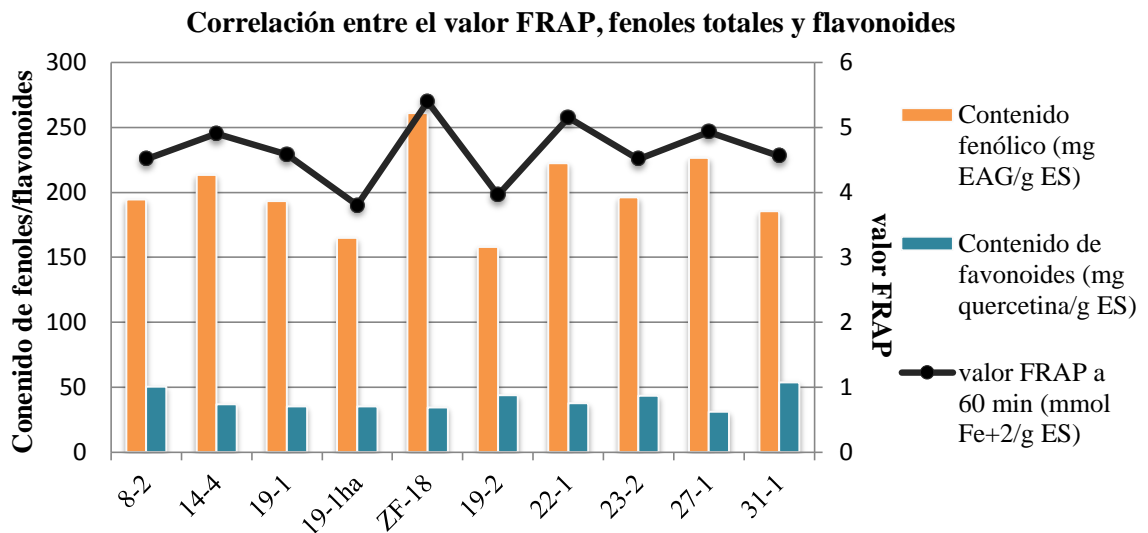
Al observar las curvas de cinética FRAP (**FIGURA 17**) es posible evidenciar que éstas dependen de la estructura química del compuesto. El patrón de trolox mantiene su valor FRAP durante todo el ensayo (60 min) debido a que posee sólo un OH libre, en cambio, los patrones de quercetina y miricitrina poseen una curva que va en aumento a medida que transcurre el tiempo. Estas últimas curvas se diferencian ligeramente en su forma, siendo más recta la obtenida por quercetina. En el caso de los EETs, estos también obtuvieron una curva de cinética que va en aumento a medida que transcurre el tiempo.

Como se nombró anteriormente, el patrón de quercetina obtuvo el mayor poder reductor sobre  $\text{Fe}^{3+}$  a los distintos tiempos, siendo aproximadamente el doble que el obtenido por miricitrina. Esto podría confirmar la importancia del OH libre en posición 3 para que un compuesto logre ejercer un buen poder reductor. En relación a esto, los bajos valores FRAP obtenidos por los EETs de murtila, en comparación a los patrones, pueden deberse a que los compuestos fenólicos de las hojas de murtila sean principalmente heterósidos flavónicos, sustituidos en 3-OH o, una segunda opción, es que se produzca un antagonismo entre los flavonoides que forman parte de la mezcla polifenólica de los EETs. Se ha descrito que existe un importante antagonismo cuando se mezcla miricetina y quercetina en el ensayo FRAP, obteniéndose una actividad antioxidante significativamente menor a la suma de los valores individuales. Por otro lado, también se postula que los flavonoides tienden a combinarse cuando están en mezclas, siendo posible que puedan ocurrir interacciones por puentes de hidrógeno que

disminuyan la actividad antioxidante otorgada por los hidroxilos libres (Hidalgo *et al.*, 2010).

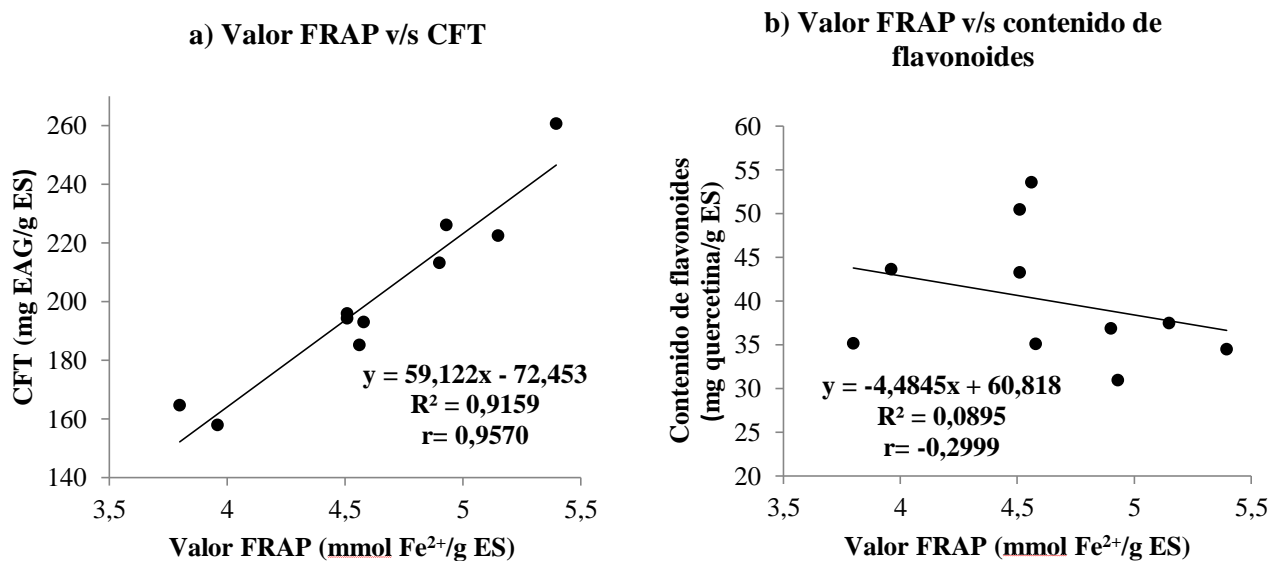
### 5.2.1.2 Correlación entre el valor FRAP, contenido fenólico total y contenido de flavonas y flavonoles de los EETs de las hojas de los genotipos de murta.

Con el fin de identificar los compuestos que tienen mayor participación en la actividad reductora de los EETs obtenidos desde las hojas de murta (flavonoides o fenoles totales), se realizó una correlación entre el valor FRAP a los 60 minutos, el contenido de fenoles totales y el contenido de flavonas y flavonoles obtenidos por los EETs.



**FIGURA 18. Correlación entre el valor FRAP, CFT y contenido de flavonoides de los EETs de hojas de los 10 genotipos de *U. molinae***

Tanto en la **FIGURA 18** como en la **FIGURA 19a** es posible observar que existe una correlación lineal ( $r=0,9570$ ) entre el CFT y el valor FRAP de los EETs, siendo los genotipos que obtuvieron mayor cantidad de fenoles totales (ZF-18, 27-1, 22-1 y 14-4) los que obtuvieron mayor capacidad reductora sobre  $\text{Fe}^{3+}$  y, a su vez, los genotipos con menor CFT fueron los que obtuvieron los menores valores FRAP (19-1ha y 19-2). No se observa esta correlación lineal ( $r=-0,2999$ ) entre el valor FRAP y el contenido de flavonas y flavonoles (**FIGURA 19b**), por lo que otros compuestos polifenólicos, diferentes a estos flavonoides, podrían estar ejerciendo el efecto reductor de los EETs.



**FIGURA 19.** a) Correlación entre el valor FRAP y el CFT y b) correlación entre el valor FRAP y la cantidad de flavonoides de los EETs de los 10 genotipos de hojas de *U. molinae*.

### 5.2.3. Ensayo de inhibición de la enzima XO

La importancia de inhibir esta enzima radica en su capacidad de reducir el O<sub>2</sub>, proceso que contribuye al aumento del estrés oxidativo en distintas patologías que involucran la acción de esta enzima, como en la enfermedad de la gota, en isquemia/reperfusión y en procesos inflamatorios (Cantu-Medellin y Kelley, 2013).

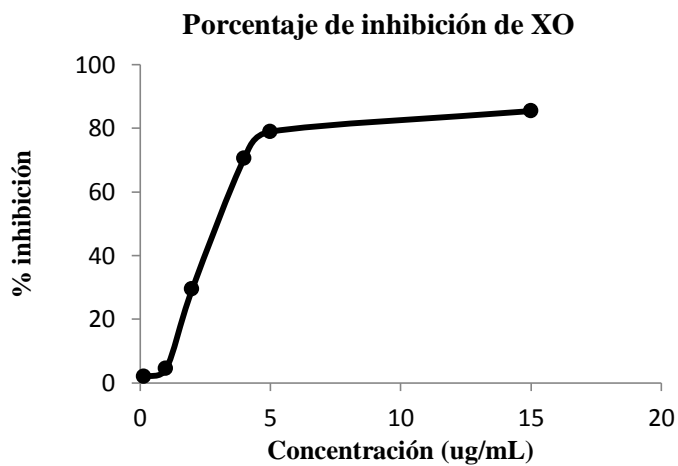
La concentración de los EETs que se utilizó para el ensayo fue de 20 µg/mL, ya que a concentraciones mayores la absorbancia propia de los EETs a 290 nm (longitud de onda a la cual se midió la absorbancia del ácido úrico) interfería en la medición.

A continuación se presentan los resultados de la inhibición sobre XO que se obtuvo con el compuesto de referencia, alopurinol (**Tabla 11 y FIGURA 20**).

**Tabla 11. CI<sub>50</sub> de la XO del alopurinol**

Concentración alopurinol (µg/mL)	% inhibición ± DS*	CI <sub>50</sub> (µg/mL ± DS)
15	83,93 ± 0,50	<b>2,49 ± 0,03</b>
5	78,90 ± 0,71	
4	70,51 ± 0,43	
2	29,34 ± 0,54	
1	4,39 ± 0,22	
0,15	2,61 ± 0,17	

\* % de inhibición calculado como el promedio de 3 determinaciones (n=3).



**FIGURA 20. Porcentaje de inhibición de la XO vs concentración ( $\mu\text{g/mL}$ ) de alopurinol**

A la concentración de 20  $\mu\text{g/mL}$ , ninguno de los EETs presentó actividad inhibitoria sobre la XO (**Tabla 12**). Este resultado se correlaciona con lo realizado en un trabajo previo, donde se analizó la inhibición de XO de diferentes especies pertenecientes a la familia Myrtaceae (Theoduloz *et al.*, 1991) y se obtuvo que un extracto hidroalcohólico de murtila, a una concentración de 50  $\mu\text{g/mL}$ , no poseía capacidad inhibitoria sobre la enzima (0%). Cabe destacar que es la primera vez que se hace un estudio comparativo de los extractos etanólicos de hojas de los 10 genotipos de murtila en este modelo.

**Tabla 12. Porcentaje de inhibición de la XO de los EETs de hojas de genotipos de murtila**

Genotipo EET	Concentración (µg/mL)	A-B ± DS	C-D ± DS	(A-B)-(C-D)	% inhibición
8-2	20	0,583 ± 0,007	0,597 ± 0,014	-0,014	0
14-4	20	0,484 ± 0,007	0,526 ± 0,012	-0,042	0
19-1	20	0,583 ± 0,007	0,607 ± 0,002	-0,023	0
19-1ha	20	0,583 ± 0,007	0,630 ± 0,005	-0,047	0
ZF-18	20	0,678 ± 0,003	0,710 ± 0,006	-0,032	0
19-2	20	0,678 ± 0,003	0,716 ± 0,007	-0,038	0
22-1	20	0,466 ± 0,033	0,534 ± 0,018	-0,068	0
23-2	20	0,678 ± 0,003	0,700 ± 0,006	-0,022	0
27-1	20	0,519 ± 0,005	0,555 ± 0,005	-0,036	0
31-1	20	0,466 ± 0,033	0,554 ± 0,027	-0,088	0
<b>Alopurinol</b>	15	0,484 ± 0,007	0,071 ± 0,003	0,484	<b>83,92 ± 0,52</b>

Dónde: A-B: absorbancia promedio del control enzimático (n=3); C-D: absorbancia promedio de la muestra (EET) (n=3); (A-B)-(C-D): diferencias de absorbancias entre el control y la muestra.

Los grupos hidroxilos en posición 5 y 7 del esqueleto estructural de los flavonoides (**FIGURA 21**) y el doble enlace entre C-2 y C-3, que otorgan una estructura planar, son importantes para que el compuesto ejerza un efecto inhibitorio sobre la XO. Los OH en C-5 y C-7 interactúan a través de puentes de hidrógeno con los residuos Glu 1261 y Arg 880 del sitio activo de la enzima, respectivamente (Da Silva *et al.*, 2004).

El efecto inhibitorio disminuye cuando los OH en C-7 o en C-3 se encuentran glicosilados y disminuye fuertemente en el caso de que los grupos en C-6 y C-8 estén sustituidos con azúcares, lo que indicaría que las interacciones por impedimento estérico reducen el efecto inhibitorio de los flavonoides sobre la XO (Cos *et al.*, 1998). Se ha demostrado que el tamaño y el carácter hidrofóbico del flavonoide son importantes para la interacción con la XO, ya que a mayor tamaño y menor  $\log P$  el efecto inhibitorio es menor (Da Silva *et al.*, 2004). Esto podría explicar el resultado que se obtuvo con los EETs analizados, ya que los flavonoides que se han identificado en las hojas de murtila corresponden principalmente a heterósidos (Rubilar *et al.*, 2006), los cuales, según lo expuesto anteriormente, poseen un menor efecto inhibitorio que los flavonoides como geninas.

Por otro lado, sería necesario conocer concentración en la que se encuentran, en las hojas de murtila de los diferentes genotipos analizados, los flavonoides que sí tienen descrito un efecto inhibitorio sobre XO, como quercetina, la cual se determinó su presencia en la CCF de algunos EETs (**FIGURA 9**), miricetina y canferol ( $CI_{50}$ : 0,44, 1,27 y 0,67  $\mu M$  respectivamente) (Nagao *et al.*, 1999). En relación a esto, en una tesis paralela realizada en el Laboratorio de Productos Naturales de la Universidad de Chile, donde se analizaron los mismos EETs que se estudiaron en este trabajo, se cuantificó la concentración de quercetina, a través de HPLC-DAD, de los EETs de cada genotipo de murtila. De acuerdo a los resultados, la concentración de este flavonoide varió entre 0,25 y 9,0 mg/g ES aprox., por lo que, probablemente, esta baja concentración no sea



suficiente para que los EETs evaluados en este ensayo, a 20 µg/mL, inhiban la enzima XO.

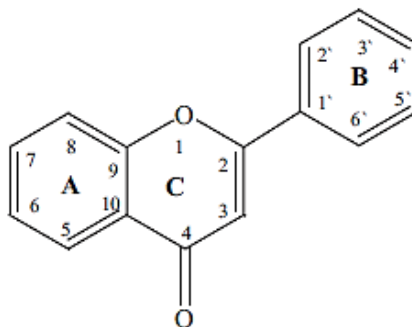


FIGURA 21. Estructura básica de los flavonoides

Tabla 13. Resumen de los resultados obtenidos para los diferentes EETs de hojas de *U. molinae* analizados

Genotipo EET	Cantidad de flavonoides (mg quercetina/ g ES ± SD)	Cantidad de Fenoles Totales (mg EAG/ g ES ± SD)	Valor FRAP a los 60 min (mmol Fe <sup>2+</sup> /g ES ± SD)	% inhibición XO
8-2	50,4 ± 0,2	194,2 ± 2,7	4,51 ± 0,12	0
14-4	36,8 ± 0,5	213,1 ± 2,7	<b>4,90 ± 0,26<sup>λ</sup></b>	0
19-1	35,1 ± 0,6	192,9 ± 2,2	4,58 ± 0,14	0
19-1 ha	35,1 ± 0,3	164,6 ± 2,9	3,80 ± 0,28	0
ZF-18	34,5 ± 0,5	<b>260,6 ± 3,8*</b>	<b>5,40 ± 0,12<sup>λ</sup></b>	0
19-2	43,6 ± 0,3	157,8 ± 2,9	3,96 ± 0,32	0
22-1	37,5 ± 0,1	222,3 ± 3,6	<b>5,15 ± 0,15<sup>λ</sup></b>	0
23-2	43,2 ± 0,6	195,9 ± 2,7	4,51 ± 0,14	0
27-1	30,9 ± 0,9	226,1 ± 1,3	<b>4,93 ± 0,05<sup>λ</sup></b>	0
31-1	<b>53,5 ± 0,8*</b>	185,0 ± 2,2	4,56 ± 0,04	0

(\*) Indica mayor valor obtenido y que presenta diferencias significativas con el resto de los EET ( $p < 0,05$ ); (<sup>λ</sup>) indica mayores valores obtenidos y que no son significativamente diferentes ( $p > 0,05$ ) entre ellos, calculado con ANOVA de una vía y test de comparaciones múltiples de Tukey.

## VI. CONCLUSIONES

- Se confirmó parcialmente la hipótesis ya que existen diferencias en la capacidad antioxidante de los EETs obtenidos desde las hojas de los diferentes genotipos de murtila y esta diferencia se debe a la variación en el contenido total de fenoles atribuida al genotipo.
- Se determinó la posible presencia de quercetina, principalmente en los EETs pertenecientes a los genotipos 8-2 y 14-4, además de la posible presencia de ácido gálico la mayoría de los genotipos.
- Los EETs de los 10 genotipos presentan diferencias significativas entre sí en el contenido de polifenoles, siendo el genotipo ZF-18 el que obtuvo la mayor CFT y el genotipo 31-1 el que obtuvo la mayor cantidad de flavonas y flavonoles.
- Se demostraron diferencias significativas entre los valores FRAP de los 10 EETs, siendo los genotipos ZF-18 y 27-1 los que obtuvieron la mayor capacidad reductora sobre  $\text{Fe}^{3+}$  a los 4, 30 y 60 min.
- Los valores FRAP obtenidos por los EETs no se correlacionan con la cantidad de flavonoides, pero sí poseen una correlación lineal con el contenido de fenoles totales.

- Los EETs de los distintos genotipos de murtilla no inhibieron a la enzima xantino oxidasa.
- El EET del genotipo ZF-18 fue el que obtuvo el mayor CFT y una de las mejores capacidades reductoras sobre  $\text{Fe}^{3+}$ , por lo que este genotipo es un buen candidato para futuros estudios, tanto químicos como farmacológicos y también para su cultivo con fines medicinales debido a que posee una gran cantidad de hojas.

## VII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AGUILA C. y Nahuelhual L., Cultivo de murtila (*Ugni molinae* Turcz.) como alternativa de diversificación productiva para la agricultura familiar campesina de la cordillera de la costa. Agro sur, 36 (3):158-167, 2008.

AGUIRRE M.C., Delporte C., Backhouse N., Eraz S., Letelier M. E., Cassels B. K., Silva X., Alegría S., Negrete R. Topical anti-inflammatory activity of 2 $\alpha$ -hydroxy pentacyclic triterpene acids from the leaves of *Ugni molinae*. Bioorganic & Medicinal Chemistry, 14 (16):5673-5677, 2006.

ALFARO S., Mutis A., Palma R., Quiroz A., Seguel I., Scheuermann E. Influence of genotype and harvest year on polyphenol content and antioxidant activity in murtila (*Ugni molinae* Turcz) fruit. Journal of Soil Science and Plant Nutrition, 13(1):67-78, 2013.

AVELLO M. y Suwalsky M. Radicales libres, antioxidantes naturales y mecanismos de protección. Atenea 494:161-172, 2006.

AVELLO M., Valdivia R., Mondaca M., Ordoñez J., Bittner M., Becerra J. Actividad de *Ugni molinae* Turcz. frente a microorganismos de importancia clínica. Boletín

Latinoamericano y del Caribe de Plantas Medicinales y Aromáticas, 8 (2):141-144, 2009.

AVELLO M., Pastene E., Bustos E., Bittner M., Becerra J. Variation in phenolic compounds of *Ugni molinae* populations and their potential use as antioxidant supplement. Brazilian Journal of Pharmacognosy, 23(1):44-50, 2013.

BENZIE I. y Strain J.J. The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of “Antioxidant Power”: The FRAP Assay. Analytical Biochemistry 239:70–76, 1996.

CANTU-MEDELLIN N. y Kelley E. Xanthine oxidoreductase-catalyzed reactive species generation: A process in critical need of reevaluation. Redox Biology 1:353–358, 2013.

CHANG C., Yang M., Wen H., Chern J. Estimation of total flavonoid content in propolis by two complementary colorimetric methods. Journal of Food and Drug Analysis, 10(3): 178-182, 2002.

CICCO N., Lanorte M.T., Paraggio M., Viggiano M., Lattanzio V. A reproducible, rapid and inexpensive Folin–Ciocalteu micro-method in determining phenolics of plant methanol extracts. Microchemical Journal 91:107–110, 2009.

COS P., Ying L., Calomme M., Hu J., Cimanga K., Van Poel B., Pieters L., Vlietink A., Vanden Berghe D. Structure-Activity relationship and classification of flavonoids as inhibitors of xanthine oxidase and superoxide scavengers. Journal of Natural Products 61(1): 71-76, 1998.

DA SILVA S.L., Da Silva A., Honório K.M., Marangonib S., Toyama M.H., Da Silva A.B.F. The influence of electronic, steric and hydrophobic properties of flavonoid compounds in the inhibition of the xanthine oxidase. Journal of Molecular Structure (Theochem), 684:1–7, 2004.

DELPORTE C., Backhouse N., Inostroza V., Aguirre M. C., Peredo N., Silva X., Negrete R., Miranda H. F. Analgesic activity of *Ugni molinae* (murtilla) in mice models of acute pain. Journal of Ethnopharmacology 112 (1):162-165, 2007.

FLÓREZ J., Fármacos hipouricemiantes y antigotosos. En su: Farmacología Humana, 3<sup>o</sup> ed., España, Masson S.A., 2007, pp.965-966.

GALILI S. y Hovav R., Determination of polyphenols, flavonoids, and antioxidant capacity in dry seeds. Polyphenols in Plants, 1:305–323, 2014.

GOITY L., Queupil M.J., Jara D., Alegría S., Peña M., Barriga A., Aguirre M.C., Delpor C. An HPLC-UV and HPLC-ESI-MS based method for identification of anti-

inflammatory triterpenoids from the extracts of *Ugni molinae*, Boletín Latinoamericano y del Caribe de Plantas Medicinales y Aromáticas, 12(1):108 – 116, 2013.

HAUSER C., Peñaloza A., Rodríguez F., Guarda A., Galotto M.J. Promising antimicrobial and antioxidant extracts of Murta leaves (*Ugni molinae* Turcz): Shelf-life extension and food safety. Food Packaging and Shelf Life, 1:77-85, 2014.

HALLIWELL B., Aeschback R., Loliger J., Aruoma O.I. The characterization of antioxidants. Food and Chemical Toxicology 33 (7):601-617, 1995.

HEIM K., Tagliaferro A., Bobilya D. Flavonoid antioxidants: chemistry, metabolism and structure-activity relationships. Journal of Nutritional Biochemistry 13:572–584, 2002.

HIDALGO M., Sánchez-Moreno C., Pascual-Teresa S., Flavonoid–flavonoid interaction and its effect on their antioxidant activity. Food Chemistry 121:691–696, 2010.

HUANG D., Ou B., Prior R., The chemistry behind antioxidant capacity assays. Journal of Agricultural and Food Chemistry 53:1841-1856, 2005.

NAGAO A., Seki M., Kobayashi H., Inhibition of xanthine oxidase by flavonoids. Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry 63(10):1787-1790, 1999.

PRIOR R., Wu X., Schaich K. Standardized methods for the determination of antioxidant capacity and phenolics in foods and dietary supplements, Journal of Agricultural and Food Chemistry 53:4290-4302, 2005.

PROCHÁZKOVÁ D., Boušová I., Wilhelmová N. Antioxidant and prooxidant properties of flavonoids. Fitoterapia 82:513–523, 2011.

RODRIGO R. y Gil-Becerra D. Implications of polyphenols on endogenous antioxidant defense systems in human diseases. Polyphenols in Human Health and Disease 1:201-217, 2014.

RUBILAR M., Pinelo M., Ihl M., Scheuermann E., Sineiro J., Nuñez M. J. Murta Leaves (*Ugni molinae* Turcz) as a Source of Antioxidant Polyphenols. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 54 (1):59-64, 2006.

RUBILAR M., Jara C., Poo Y., Acevedo F., Gutierrez C., Sineiro J., Shene C. Extracts of Maqui (*Aristotelia chilensis*) and Murta (*Ugni molinae* Turcz.): Sources of Antioxidant Compounds and  $\alpha$ -Glucosidase/ $\alpha$ -Amylase Inhibitors. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 59:1630–1637, 2011.



SEGUEL I., Peñaloza E., Gaete N., Montenegro A., Torres A., Colecta y caracterización molecular de germoplasma de murta (*Ugni molinae* Turcz.) en Chile. Agro sur, 28(2):32-41, 2000.

SINGLETON V.L. y Rossi J. A., Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents. American Journal of Enology and Viticulture 16 (3):144-158, 1965.

THEODULOZ C., Pacheco P., Schmeda-Hirschmann G., Xanthine oxidase inhibitory activity of Chilean Myrtaceae. Journal of Ethnopharmacology, 33:253-255, 1991.

UMAMAHESWARI M., Asokkumar K., Sivashanmugam A.T., Remyaraju A., Subhadradevi V., Ravi T.K. In vitro xanthine oxidase inhibitory activity of the fractions of *Erythrina stricta* Roxb. Journal of Ethnopharmacology, 124:646–648, 2009.

## ANEXOS

**Anexo 1.** Tablas de diferencias significativas entre los EETs de los 10 genotipos de hojas de murtila, para cada ensayo realizado.

**1A.** Diferencias significativas respecto al contenido de fenoles totales: ensayo de Folin-Ciocalteu

	EET 8-2	EET 14-4	EET 19-1	EET 19-1 ha	EET 19-2	EET 22-1	EET 23-2	EET 27-1	EET 31-1	EET ZF-18
<b>EET 8-2</b>		Sí	No	Sí	Sí	Sí	No	Sí	Sí	Sí
<b>EET 14-4</b>	Sí		Sí	Sí	Sí	Sí	Sí	Sí	Sí	Sí
<b>EET 19-1</b>	No	Sí		No	Sí	Sí	No	Sí	No	Sí
<b>EET 19-1 ha</b>	Sí	Sí	No		No	Sí	Sí	Sí	Sí	Sí
<b>EET 19-2</b>	Sí	Sí	Sí	No		Sí	Sí	Sí	Sí	Sí
<b>EET 22-1</b>	Sí	Sí	Sí	Sí	Sí		Sí	Sí	Sí	Sí
<b>EET 23-2</b>	No	Sí	No	Sí	Sí	Sí		Sí	Sí	Sí
<b>EET 27-1</b>	Sí	Sí	Sí	Sí	Sí	Sí	Sí		Sí	Sí
<b>EET 31-1</b>	Sí	Sí	No	Sí	Sí	Sí	Sí	Sí		Sí
<b>EET ZF-18</b>	Sí	Sí	Sí	Sí	Sí	Sí	Sí	Sí	Sí	

Sí significa que existen diferencias significativas ( $p < 0,05$ ) entre el CFT de los EETs pertenecientes a los 10 genotipos de murtila analizados, calculado con ANOVA de una vía y test de comparaciones múltiples de Tukey

**1B. Diferencias significativas respecto al contenido de flavonoides: ensayo colorimétrico con AlCl<sub>3</sub>**

	EET 8-2	EET 14-4	EET 19-1	EET 19-1 ha	EET 19-2	EET 22-1	EET 23-2	EET 27-1	EET 31-1	EET ZF-18
<b>EET 8-2</b>		Sí	Sí	Sí	Sí	Sí	Sí	Sí	Sí	Sí
<b>EET 14-4</b>	Sí		Sí	Sí	Sí	No	Sí	Sí	Sí	Sí
<b>EET 19-1</b>	Sí	Sí		No	Sí	Sí	Sí	Sí	Sí	No
<b>EET 19-1 ha</b>	Sí	Sí	No		Sí	Sí	Sí	Sí	Sí	No
<b>EET 19-2</b>	Sí	Sí	Sí	Sí		Sí	No	Sí	Sí	Sí
<b>EET 22-1</b>	Sí	No	Sí	Sí	Sí		Sí	Sí	Sí	Sí
<b>EET 23-2</b>	Sí	Sí	Sí	Sí	No	Sí		Sí	Sí	Sí
<b>EET 27-1</b>	Sí	Sí	Sí	Sí	Sí	Sí	Sí		Sí	Sí
<b>EET 31-1</b>	Sí	Sí	Sí	Sí	Sí	Sí	Sí	Sí		Sí
<b>EET ZF-18</b>	Sí	Sí	No	No	Sí	Sí	Sí	Sí	Sí	

Sí significa que existen diferencias significativas ( $p < 0,05$ ) entre la cantidad de flavonas y flavonoles de los EETs pertenecientes a los 10 genotipos de murtilla analizados, calculado con ANOVA de una vía y test de comparaciones múltiples de Tukey

**1C. Diferencias significativas respecto al valor FRAP calculado a los 4 minutos: ensayo FRAP**

	EET 8-2	EET 14-4	EET 19-1	EET 19-1 ha	EET 19-2	EET 22-1	EET 23-2	EET 27-1	EET 31-1	EET ZF-18
<b>EET 8-2</b>		No	No	Sí	No	No	No	No	No	Sí
<b>EET 14-4</b>	No		No	Sí	No	No	No	No	No	Sí
<b>EET 19-1</b>	No	No		No	No	No	No	No	No	Sí
<b>EET 19-1 ha</b>	Sí	Sí	No		No	Sí	Sí	Sí	Sí	Sí
<b>EET 19-2</b>	No	No	No	No		No	No	No	No	Sí
<b>EET 22-1</b>	No	No	No	Sí	No		No	No	No	Sí
<b>EET 23-2</b>	No	No	No	Sí	No	No		No	No	Sí
<b>EET 27-1</b>	No	No	No	Sí	No	No	No		No	No
<b>EET 31-1</b>	No	No	No	Sí	No	No	No	No		No
<b>EET ZF-18</b>	Sí	Sí	Sí	Sí	Sí	Sí	Sí	No	No	

Sí significa que existen diferencias significativas ( $p < 0,05$ ) entre los valores FRAP a los 4 minutos de los EETs pertenecientes a los 10 genotipos de murtilla analizados, calculado con ANOVA de una vía y test de comparaciones múltiples de Tukey

**1D. Diferencias significativas respecto al valor FRAP calculado a los 30 minutos: ensayo FRAP**

	EET 8-2	EET 14-4	EET 19-1	EET 19-1 ha	EET 19-2	EET 22-1	EET 23-2	EET 27-1	EET 31-1	EET ZF-18
<b>EET 8-2</b>		No	No	Sí	No	No	No	No	No	Sí
<b>EET 14-4</b>	No		No	Sí	No	No	No	No	No	Sí
<b>EET 19-1</b>	No	No		No	No	No	No	No	No	Sí
<b>EET 19-1 ha</b>	Sí	Sí	No		No	Sí	Sí	Sí	Sí	Sí
<b>EET 19-2</b>	No	No	No	No		No	No	No	No	Sí
<b>EET 22-1</b>	No	No	No	Sí	No		No	No	No	Sí
<b>EET 23-2</b>	No	No	No	Sí	No	No		No	No	Sí
<b>EET 27-1</b>	No	No	No	Sí	No	No	No		No	No
<b>EET 31-1</b>	No	No	No	Sí	No	No	No	No		No
<b>EET ZF-18</b>	Sí	Sí	Sí	Sí	Sí	Sí	Sí	No	No	

Sí significa que existen diferencias significativas ( $p < 0,05$ ) entre los valores FRAP, a los 30 minutos, de los EETs pertenecientes a los 10 genotipos de murtilla analizados, calculado con ANOVA de una vía y test de comparaciones múltiples de Tukey.

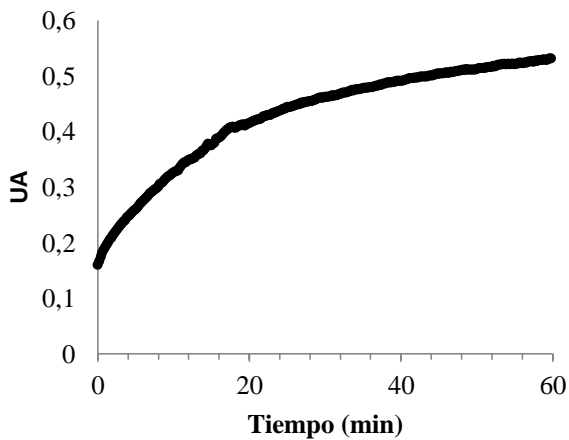
**1E. Diferencias significativas respecto al valor FRAP calculado a los 60 minutos: ensayo FRAP**

	EET 8-2	EET 14-4	EET 19-1	EET 19-1 ha	EET 19-2	EET 22-1	EET 23-2	EET 27-1	EET 31-1	EET ZF-18
<b>EET 8-2</b>		No	No	Sí	Sí	Sí	No	No	No	Sí
<b>EET 14-4</b>	No		No	Sí	Sí	No	No	No	No	No
<b>EET 19-1</b>	No	No		Sí	Sí	Sí	No	No	No	Sí
<b>EET 19-1 ha</b>	Sí	Sí	Sí		No	Sí	Sí	Sí	Sí	Sí
<b>EET 19-2</b>	Sí	Sí	Sí	No		Sí	Sí	Sí	Sí	Sí
<b>EET 22-1</b>	Sí	No	Sí	Sí	Sí		Sí	No	Sí	No
<b>EET 23-2</b>	No	No	No	Sí	Sí	Sí		No	No	Sí
<b>EET 27-1</b>	No	No	No	Sí	Sí	No	No		No	No
<b>EET 31-1</b>	No	No	No	Sí	Sí	Sí	No	No		Sí
<b>EET ZF-18</b>	Sí	No	Sí	Sí	Sí	No	Sí	No	Sí	

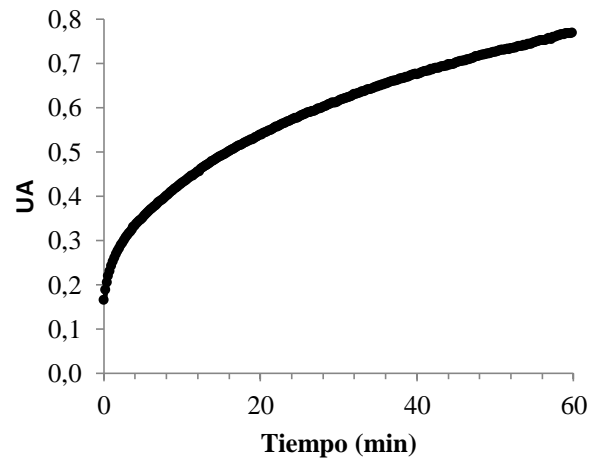
Sí significa que existen diferencias significativas ( $p < 0,05$ ) entre los valores FRAP, a los 60 minutos, de los EETs pertenecientes a los 10 genotipos de murtilla analizados, calculado con ANOVA de una vía y test de comparaciones múltiples de Tukey.

**Anexo 2.** Curvas de cinética FRAP obtenidas para los EETs de hojas de murtillo de cada genotipo analizado, donde las gráficas representan el avance de la reacción de reducción de  $\text{Fe}^{3+}$  a  $\text{Fe}^{2+}$  mediada por cada EET, durante 60 minutos.

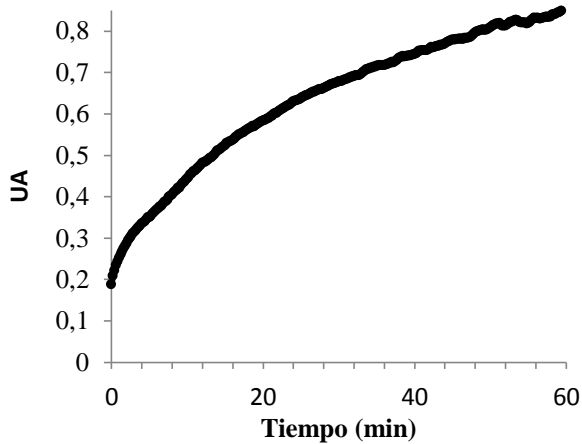
**2A.** EET 8-2 (6,7  $\mu\text{g/mL}$ )



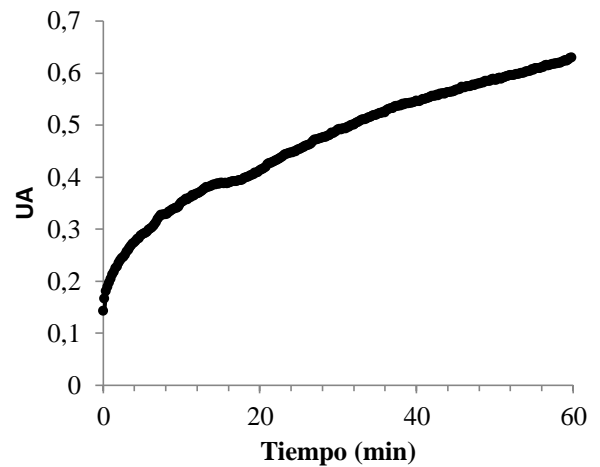
**2B.** EET 14-4 (8,3  $\mu\text{g/mL}$ )



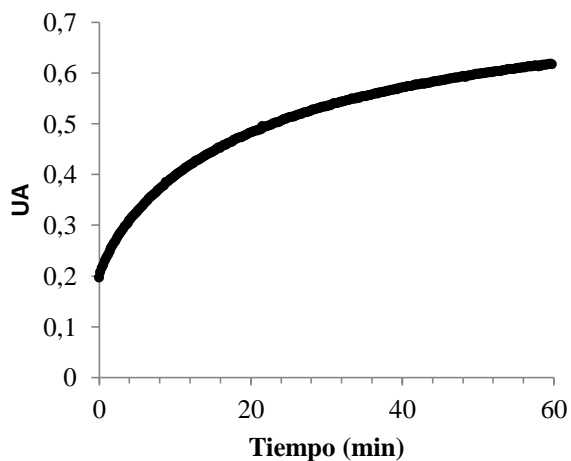
**2C.** EET 19-1 (10  $\mu\text{g/mL}$ )



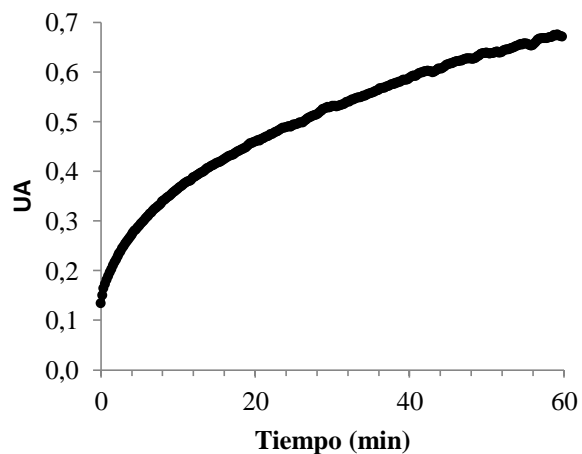
**2D.** EET 19-1 ha (10  $\mu\text{g/mL}$ )



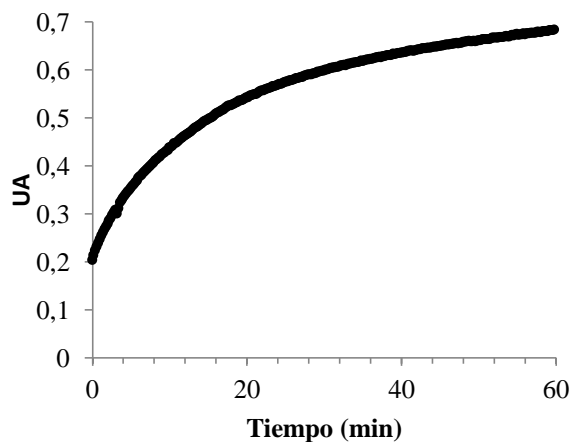
**2E. EET 19-2 (8,3 µg/mL)**



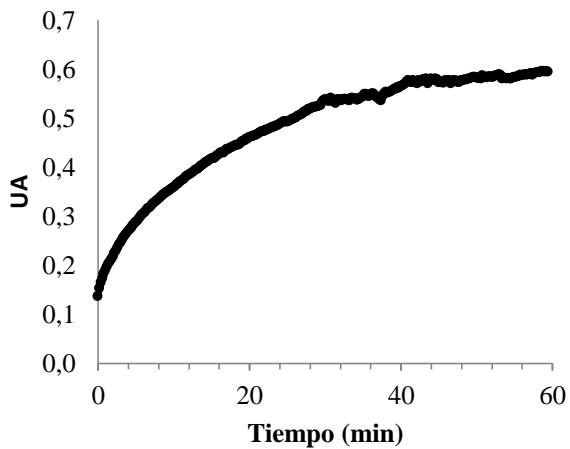
**2F. EET 22-1 (7,3 µg/mL)**



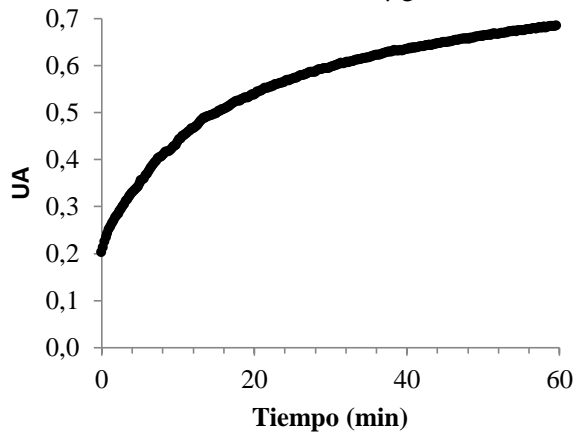
**2G. EET 23-2 (8,3 µg/mL)**



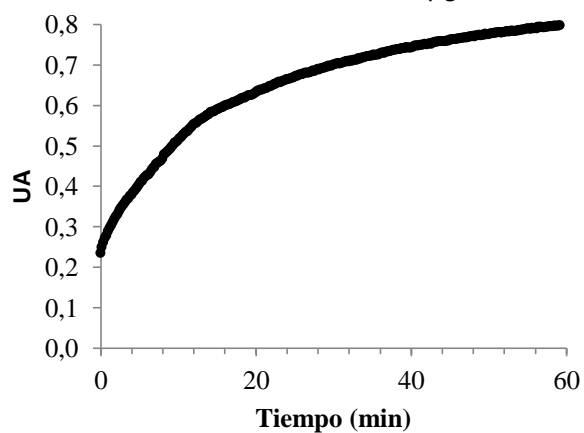
**2H. EET 27-1 (6,7 µg/mL)**



**2I. EET 31-1 (8,3 µg/mL)**



**2J. EET ZF-18 (8,3 µg/mL)**



**Anexo 3.** Fotografías de los testigos herbarios de los 10 genotipos de *U. molinae*.



**3A.** Murtilla, genotipo 8-2  
Selección por cantidad de hojas  
SQF 22571



**3B.** Murtilla, genotipo 14-4  
Selección por cantidad de hojas  
SQF 22549



**3C.** Murtilla, genotipo 19-1  
Selección por cantidad de hojas  
SQF 22554



**3D.** Murtilla, genotipo 19-1 ha  
Selección por cantidad de hojas  
SQF 222553



**3E.** Murtilla, genotipo 19-2  
Selección por cantidad de hojas  
SQF 22557



**3F.** Murtilla, genotipo 22-1  
Selección por calidad del fruto  
SQF 22553



**3G.** Murtilla, genotipo 23-2  
Selección por cantidad de hojas  
SQF 22556



**3H.** Murtilla, genotipo 27-1  
Selección por cantidad de hojas  
SQF 22555



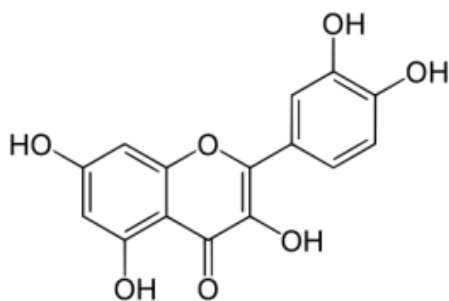
**3I.** Murtilla, genotipo 31-1  
Selección por cantidad de hojas  
SQF 22551



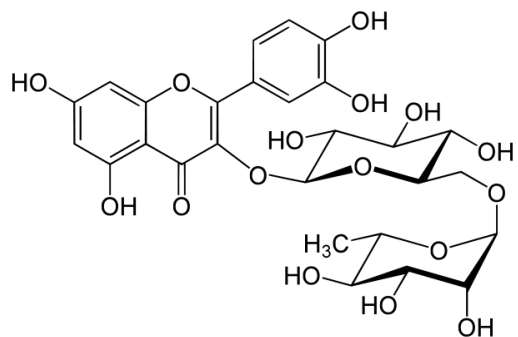
**3J.** Murtilla, genotipo ZF-18  
Selección por cantidad de hojas  
SQF 22550



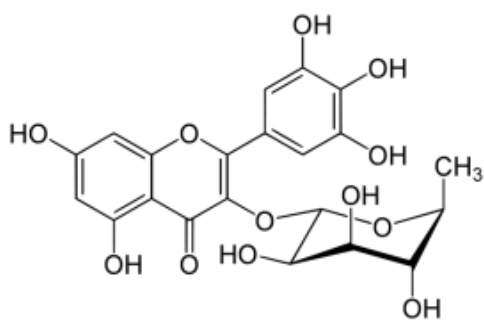
#### Anexo 4. Estructuras químicas de los patrones utilizados en el estudio



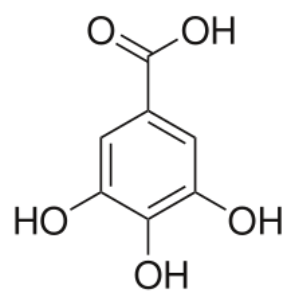
4A. Quercetina



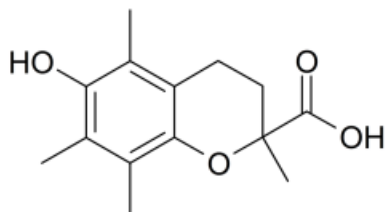
4B. Rutina



4C. Miricitrina



4D. Ácido gálico



4E. Trolox

## Anexo 5. Resúmenes de congresos asistidos

### 5A. DETERMINATION OF PHENOLIC AND FLAVONOID CONTENT, AND EVALUATION OF THE REDUCTIVE CAPACITY OVER $Fe^{+3}$ OF DIFFERENT *UGNI MOLINAE* GENOTYPES

Valenzuela-Bustamante P.<sup>1</sup>, Peña-Cerda M.<sup>1</sup>, Pérez-Arancibia R.<sup>1</sup>, García L.<sup>1</sup>, Seguel I.<sup>2</sup>, Delporte C.<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Laboratorio de Productos Naturales, Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas, Universidad de Chile., Santos Dumont 964, Independencia, Santiago, Chile. <sup>2</sup>INIA, Carillanca, IX Región.

*Ugni molinae* Turcz., Myrtaceae, is a Chilean shrub also known as “murtilla”, “murta” or “uñi” [1], used in folk medicine because of its health beneficial effects. The properties attributed to its leaves are due in part to the presence of different phenolic compounds that have been identified in its extracts, such as tannins and flavonoids [2], and its antioxidant activity [2,3,4]. Because this chemical composition can be affected by different factors (i.e. the genotype), the aim of this study was to determine and compare the flavonoid content ( $AlCl_3$  colorimetric assay), total phenolic content (Folin-Ciocalteu assay) and the antioxidant activity (Ferric Reducing Antioxidant Power, FRAP assay) in ethanolic leaves extracts (EETs) of 5 different genotypes of murtilla cultivated under the same conditions and selected by their quantity of leaves. Significant differences ( $p < 0,05$ ) were found in the results of the assays, being the ZF-18 genotype the one that presented the highest phenolic content ( $259.59 \pm 3.83$  GAE  $g^{-1}$  dry matter (dm)) and the highest FRAP value ( $5.40 \pm 0.12$  mmol  $Fe^{+2}$   $g^{-1}$  dm at 60 min). The 19-2 genotype presented the lowest values in the two assays ( $157.63 \pm 2.96$  GAE  $g^{-1}$  dm y  $4.51 \pm 0.14$  mmol  $Fe^{+2}$   $g^{-1}$  dm, respectively). No correlation was found in the total flavonoid content, being the 31-1 genotype the one that obtained the highest value ( $53.52 \pm 0.79$  mg quercetin  $g^{-1}$  dm). There are significant differences in the chemical composition and the antioxidant activity of murta leaves extracts that can be attributable to genotype.

*Acknowledgements:* FONDECYT 1130155; Beca CONICYT N°21120377, INIA, Carillanca, Chile.

**References:** 1. Avello M., Mondaca R. et al., (2009), BLACPM 8 (2), 141 – 144; 2. Rubilar M., Pinelo M. et al. (2006), J. Agric. Food Chem., 54(1):59-64; 3. Avello M., Pastene E. et al., (2013), Rev. Bras. Farmacogn. 23(1): 44-5; 4. Rubilar M., Jara C. et al., (2011), J. Agric. Food Chem., 59, 1630-1637.

**5B. Diferencias en el valor FRAP y contenido fenólico entre diferentes genotipos de *Ugni molinae* Turcz.**

**(Differences on the FRAP value and phenolic content between different *Ugni molinae* Turcz. genotypes)**

Paula Valenzuela-Bustamante<sup>1</sup>, Marcelo Peña-Cerda<sup>1</sup>, Rodrigo Pérez-Arancibia<sup>1</sup>, Ivette Seguel<sup>2</sup>, Lorena García<sup>1</sup>, Carla Delporte<sup>1</sup>.

<sup>1</sup>Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas, Universidad de Chile, Santiago, Chile.

<sup>2</sup>INIA, Carillanca, IX Región, Chile.

E-mail: [frozenpeak@um.uchile.cl](mailto:frozenpeak@um.uchile.cl)

*Ugni molinae*, Myrtaceae, es un arbusto silvestre que crece en el sur de Chile, especialmente en la cordillera de la Costa y parte de la precordillera andina<sup>1</sup>. Las infusiones de hojas de murtila se han utilizado por la medicina folclórica para el tratamiento de distintos tipos de dolor e inflamación<sup>3</sup>. Sus propiedades se deben, en parte, a la presencia de diferentes compuestos fenólicos en sus hojas<sup>1,2</sup>, entre los cuales se han identificado derivados glicosilados de epicatequina, canferol, miricetina y quercetina<sup>1</sup>. Los efectos protectores de los flavonoides en el organismo se asocian a su capacidad de transferir electrones a radicales libres, quelación de metales, activar enzimas antioxidantes, entre otros<sup>4</sup>. Debido a que el contenido de estos compuestos puede variar por diversos factores, como el genotipo, en este estudio se analizaron extractos etanólicos seriados (EET) de hojas de cinco genotipos de murtila (22-1, 27-1, 14-4, 19-1 y 19-1 ha) los cuales fueron cultivados bajo las mismas condiciones. Para el análisis comparativo del contenido fenólico se realizó el ensayo de Folin-Ciocalteu (F-C) y el ensayo colorimétrico con AlCl<sub>3</sub>, con el fin de determinar la cantidad de flavonas y flavonoles. La actividad antioxidante se determinó mediante el ensayo FRAP (*Ferric Reducing Antioxidant Power*), con el cual se evaluó la capacidad que poseen los EET de reducir Fe<sup>3+</sup> a Fe<sup>2+</sup>. Se encontraron diferencias significativas (p<0,05) entre algunos de los resultados, siendo los genotipos 22-1 y 27-1 los que obtuvieron los mayores valores, tanto en la cantidad de fenoles totales (221,00 ± 4,51 y 222,28 ± 1,15 mg EAG g<sup>-1</sup> extracto etanólico seco (EETs), respectivamente), como en el valor FRAP a los 60 min (5,15 ± 0,15 y 4,93 ± 0,05 mmol Fe<sup>2+</sup> g<sup>-1</sup> EETs, respectivamente). El genotipo 19-1 ha fue el que presentó los valores más bajos en ambos ensayos (166,82 ± 2,84 mg EAG g<sup>-1</sup> EETs de fenoles totales y 3,80 ± 0,28 mmol Fe<sup>2+</sup> g<sup>-1</sup> EETs de valor FRAP). Los resultados del ensayo con AlCl<sub>3</sub> no se correlacionaron con los obtenidos en los ensayos de F-C y FRAP, siendo el genotipo 27-1 el que obtuvo la menor concentración de flavonoides (30,89 ± 0,96 mg quercetina g<sup>-1</sup> EETs).

Agradecimientos: FONDECYT 1130155, Beca CONICYT N°21120377, INIA Carillanca, Chile.

Referencias: 1. Rubilar M, Pinelo M, Ihl M, Scheuermann E, Sineiro J, Nuñez MJ. 2006. Murta leaves (*Ugni molinae* Turcz) as a Source of Antioxidant Polyphenols, **J. Agric. Food Chem** 54(1):59-64. 2. Avello M., Mondaca R., Ordoñez M., Bittner J., Becerra M. 2009. Actividad de *Ugni molinae* Turcz. frente a microorganismos de importancia clínica, **BLACPMA** 8(2):141 – 144. 3. Delporte C., Backhouse N., Inostroza V., Aguirre M., Peredo N., Silva X., Negrete R., Miranda H. 2007. Analgesic activity of *Ugni molinae* (murtila) in mice models of acute pain, **J. Ethnopharmacol** 112(1):162-165, 4. Heim K., Tagliaferro A., Bobilya D. 2002. Flavonoid antioxidants: chemistry, metabolism and structure-activity relationships, **J. Nutr. Biochem** 13(10):572–584.