

UNIVERSIDAD DE CHILE
FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS Y FARMACÉUTICAS



**EVALUACIÓN COMPARATIVA DE LA ACTIVIDAD
CICATRIZANTE CUTÁNEA DE EXTRACTOS
CONCENTRADOS EN FENOLES Y EN
TRITERPENOIDES OBTENIDOS DE HOJAS DE
DISTINTOS GENOTIPOS DE *UGNI MOLINAE* TURCZ.**

**Tesis presentada a la Universidad de Chile para optar al grado de
Doctora en Ciencias Farmacéuticas por:**

PAULA DENISSE VALENZUELA BUSTAMANTE

Directores de Tesis:

Dra. Carla Delporte V.

Dr. Guillermo Díaz A.

Codirectora:

Mg. Olosmira Correa

Santiago, 2020

UNIVERSIDAD DE CHILE
FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS Y FARMACÉUTICAS

INFORME DE APROBACIÓN DE TESIS DE DOCTORADO

Se informa a la Dirección de la Escuela de Graduados de la Facultad de Ciencias
Químicas y Farmacéuticas presentada por la candidata

PAULA DENISSE VALENZUELA BUSTAMANTE

Ha sido aprobada por la Comisión de Evaluadora de Tesis como requisito para
optar al grado de Doctora en Ciencias Farmacéuticas en el examen público rendido
el día _____

Directores de Tesis:

Dra. Carla Delporte V.

Dr. Guillermo Díaz A.

Codirectora de Tesis:

Mg. Olosmira Correa

Comisión Evaluadora de Tesis:

Dra. Lorena García (presidente)

Dr. Bruce Cassels

Dra. Silvia Debenedetti

Dr. Mario Chiong

A mis padres

AGRADECIMIENTOS

En primer lugar, quiero agradecer a la Dra. Carla Delporte y al Dr. Guillermo Díaz, mis directores de tesis. Gracias por su apoyo y confianza durante la propuesta y el desarrollo de este proyecto, ambos son personas que admiro enormemente, por lo que estoy muy agradecida de haber podido llevar a cabo esta tesis bajo sus tutelas. Gracias también a mi co-directora, la Profesora Olosmira Correa, por su apoyo, sus consejos y especialmente, gracias por todos los conocimientos que me traspasó de Tecnología Cosmética (es mi mentora).

Gracias a todos mis amigos y compañeros de la vida y del laboratorio. A Rubén por su amistad de siempre, por esas tardes que nos quedábamos trabajando y tratando de solucionar el mundo, por sus consejos, ayuda y conocimiento sin pedir nada a cambio. Gracias a mis amigas, Fefa, Irene, Pauli, Javi y Cindy, por haber hecho más entretenido todo este proceso y por tener siempre las palabras precisas cuando el estrés me superaba. Gracias a Jenaro, por estar siempre cuando necesitaba un respaldo o un desahogo, a los “pharmaciuticals” por el aguante y los schopitos compartidos. Gracias a Gaby, Marcelo, Pao, Ara, David, Ale y a todo el equipo de Productos Naturales y del Laboratorio de Farmacología por la ayuda brindada cada vez que lo necesitaba.

Gracias a mi familia, a mi hermano, mis primas, tías, tíos y abuelos por el apoyo de siempre, por el cariño y los buenos momentos que pasamos juntos y que siempre me han recargado de energía. Agradezco especialmente a mi mamá y a mi papá, por creer siempre en mí, por su amor incondicional y por ser mis pilares fundamentales en todo momento. Todos mis logros son por y para ellos.

Gracias a mi pareja y amigo, Nico, por el cariño, la paciencia y el ánimo que me ha entregado durante los últimos años de este proceso. Su amor fue fundamental para enfrentar de mejor forma este desafío.

Gracias a Alexandra Elbakyan, la fundadora de Sci-Hub. Sin su página web habría sido imposible escribir esta tesis ya que muchos de los artículos que utilicé como referencias no eran de libre acceso.

Finalmente, agradezco a todos aquellos que fueron parte de este proceso, ya sea en el ámbito científico, laboral o de amistad. De todos aprendí algo distinto y gracias a ello pude crecer profesional y personalmente durante estos años.

FINANCIAMIENTO

El desarrollo de esta tesis doctoral ha sido financiado gracias al Proyecto FONDECYT N°1130155 (dirigido por la Dra. Carla Delporte), al Proyecto FONDECYT N°1170425 (dirigido por el Dr. Guillermo Díaz) y a la beca CONICYT-PCHA/Doctorado Nacional/2015-21150688.

TABLA DE CONTENIDOS

ABREVIATURAS.....	IX
ÍNDICE DE TABLAS.....	XI
ÍNDICE DE FIGURAS.....	XIII
ÍNDICE DE ANEXOS.....	XVI
RESUMEN.....	XVIII
ABSTRACT.....	XX
I. INTRODUCCIÓN.....	1
II. HIPÓTESIS.....	15
III. OBJETIVO GENERAL.....	15
IV. OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	16
V. MATERIALES Y MÉTODOS.....	17
5.1. MATERIALES.....	17
5.2. METODOLOGÍAS.....	18
5.2.1. MATERIAL VEGETAL.....	18
5.2.2. EXTRACCIÓN SERIADA DE LAS HOJAS DE <i>U. MOLINAE</i> DE DISTINTOS GENOTIPOS.....	19
5.2.3. SELECCIÓN DE LOS EETs Y EAES DE DISTINTOS GENOTIPOS DE MURTILLA Y DIFERENCIADOS POR SU COMPOSICIÓN QUÍMICA.....	20
5.2.3.1. Determinación del contenido de fenoles totales (CFT) y del contenido de taninos totales (CTT) en los EETs y EAES de los 10 genotipos de murtilla.....	22
5.2.3.2. Contenido de triterpenos pentacíclicos (TPCs) de los EAES de los 10 genotipos de murtilla.....	23
5.2.4. CARACTERIZACIÓN QUÍMICA COMPARATIVA DEL EET Y EAE DE LAS HOJAS DEL GENOTIPO CON MAYOR CONTENIDO DE POLIFENOLES: G. ZF-18.....	24
5.2.4.1. Determinación del contenido de fenoles totales (CFT) y del contenido de taninos totales (CTT)	25

5.2.4.2. Determinación del contenido total de flavonas y flavonoles (CFF).....	25
5.2.4.3. Cuantificación de triterpenos pentacíclicos (TPCs) mediante CLAE-DAD.....	26
5.2.4.4. Determinación del perfil fenólico mediante CLAE-UV-EM ⁿ	27
5.2.4.5. Derreplicación de alto rendimiento (<i>High-Throughput Dereplication</i>) y redes moleculares (<i>molecular networking</i>) para la identificación de compuestos fenólicos.....	28
5.2.5. EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE <i>IN VITRO</i> DEL EET y EAE del G. ZF-18₂₀₁₅.....	31
5.2.5.1. Ferric reducing antioxidant power (FRAP)	32
5.2.5.2. Apagamiento del radical 2,2-difenil-1-picrilhidrazilo (DPPH)..	33
5.2.6. EVALUACIÓN DEL EFECTO <i>IN VITRO</i> DE LOS EETs y EAES SELECCIONADOS SOBRE LA FUNCIONALIDAD DE FIBROBLASTOS DÉRMICOS HUMANOS.....	34
5.2.6.1. Pruebas de solubilidad de los EAES y EETs.....	34
5.2.6.2. Aislamiento de fibroblastos dérmicos humanos (FDHs) a partir de cultivo primario.....	35
5.2.6.3. Pasajes celulares y criopreservación de los FDHs.....	37
5.2.6.4. Viabilidad celular.....	38
5.2.6.5. Migración celular determinada mediante el ensayo de la herida <i>in vitro</i> (<i>scratch assay</i>)	41
5.2.6.6. Adhesión celular.....	42
5.2.6.7. Proliferación celular	43
5.2.7. EVALUACIÓN DEL EFECTO DE LOS EETs y EAES SELECCIONADOS SOBRE LA EXPRESIÓN DE PROTEÍNAS DE LA MATRIZ EXTRACELULAR Y SOBRE LA DIFERENCIACIÓN DE FIBROBLASTOS A MIOFIBROBLASTOS.....	45
5.2.7.1. Expresión de los niveles de procolágeno tipo I, colágeno tipo III, fibronectina y α -SMA.....	45
5.2.7.1.1. Viabilidad celular a las 72 h.....	45
5.2.7.1.2. Western blot.....	46

5.2.7.2. Contracción de geles de colágeno.....	49
5.2.8. ESTUDIO COMPLEMENTARIO: EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA DE LOS EETs Y EAES SELECCIONADOS.....	50
5.2.8.1. Determinación de la concentración mínima inhibitoria (CIM).....	50
5.2.9. ANÁLISIS ESTADÍSTICO.....	51
VI. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	52
6.1. SELECCIÓN DE LOS EETs Y EAES DE DISTINTOS GENOTIPOS DE MURTILLA Y DIFERENCIADOS POR SU COMPOSICIÓN QUÍMICA.....	52
6.1.1. Contenido fenólico total y contenido de taninos totales en los EETs y EAES de las hojas de <i>U. molinae</i> recolectadas en el año 2013.....	52
6.1.2. Contenido de triterpenos pentacíclicos (TPCs) de los EAES de los 10 genotipos de murtilla.....	54
6.1.3. EETs y EAES seleccionados para conformar los grupos 1 y 2.....	55
6.2. CARACTERIZACIÓN QUÍMICA DEL EET Y EAE DE LAS HOJAS DE MURTILLA DEL GENOTIPO CON MAYOR CONTENIDO DE POLIFENOLES (G. ZF-18) Y COMPARACIÓN ENTRE LOS EXTRACTOS DE HOJAS DE DISTINTOS AÑOS DE RECOLECCIÓN	55
6.2.1. Obtención de los extractos seriados de las hojas del G. ZF-18 ₂₀₁₅	55
6.2.2. Análisis químico del EET y EAE de las hojas del G. ZF-18 ₂₀₁₅	57
6.2.2.1. Determinación del contenido fenólico total (CFT) y contenido de taninos totales (CTT) mediante el reactivo de Folin-Ciocalteu.....	58
6.2.2.2. Contenido de flavonas y flavonoles (CFF).....	59
6.2.2.3. Cuantificación de triterpenos pentacíclicos (TPCs) mediante CLAE-DAD.....	60
6.2.2.4. Identificación de compuestos fenólicos mediante CLAE-UV-EM/EM.....	64
6.2.2.4.2. Derreplicación (<i>High-Throughput Dereplication</i>) de compuestos fenólicos en la plataforma GNPS.....	65

6.2.2.4.3. Redes moleculares (<i>molecular networking</i>).....	73
6.3. ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE <i>IN VITRO</i> DEL EET y EAE G. ZF-18₂₀₁₅.....	81
6.3.1. <i>Ferric reducing antioxidant power</i> (FRAP).....	81
6.3.2. Apagamiento del radical 2,2-difenil-1-picrilhidrazilo (DPPH)	83
6.3.3. Resumen de la composición química y de la actividad antioxidante de EETs y EAEs obtenidos de las hojas del genotipo 19-2 y del G. ZF-18.....	85
6.4. EFECTO DE LOS EETs y EAEs DE LOS GENOTIPOS 19-2 y ZF-18₂₀₁₅ SOBRE FUNCIONES DE FIBROBLASTOS DÉRMICOS HUMANOS ASOCIADAS A CICATRIZACIÓN.....	88
6.4.1. Solubilidad de los extractos seleccionados en medio acuoso.....	88
6.4.2. Aislamiento de fibroblastos dérmicos humanos (FDHs) a partir de cultivo primario.....	90
6.4.3. Viabilidad celular.....	91
6.4.4. Migración celular por el método de la herida (<i>Scratch assay</i>).....	97
6.4.5. Adhesión celular.....	101
6.4.6. Proliferación celular	106
6.4.7. Viabilidad celular de los FDHs a las 72 h.....	108
6.4.8. Expresión de proteínas de la matriz extracelular (MEC)	111
6.4.9. Contracción de geles de colágeno.....	117
6.5. ESTUDIO COMPLEMENTARIO.....	118
6.5.1. Determinación de la concentración mínima inhibitoria (CIM)	118
VII. RESUMEN DE LOS RESULTADOS DEL EFECTO DE LOS EETs Y EAEs SELECCIONADOS SOBRE FUNCIONES DE FIBROBLASTOS DÉRMICOS HUMANOS ASOCIADAS A CICATRIZACIÓN.....	120
VIII. CONCLUSIONES.....	122
IX. REFERENCIAS.....	125
X. ANEXOS.....	136

ABREVIATURAS

α -SMA	: <i>Alpha-smooth muscle actin</i>
ANOVA	: Análisis de varianza
ATCC	: <i>American type culture collection</i>
BrdU	: Bromodesoxuridina
BSA	: Albúmina de suero bóvino
CE ₅₀	: Concentración efectiva 50
CFT	: Contenido fenólico total
CFF	: Contenido de flavonas y flavonoles
CIM	: Concentración inhibitoria mínima
CL ₅₀	: Concentración letal 50
CLAE	: Cromatografía líquida de alta eficiencia
CLAE-EM	: Cromatografía líquida de alta eficiencia acoplada a un espectrómetro de masas
CTT	: Contenido de taninos totales
DAD	: Detector de arreglo de diodos
DE	: Desviación estándar
EDCM	: Extracto de diclorometano
EH	: Extracto de hexano
DMEM/F-12	: <i>Dulbecco's modified eagle medium (nutrient mixture F-12)</i>
DMSO	: Dimetilsulfóxido
DPPH	: 1,1-difenil-2-picrilhidrazilo
<i>E. coli</i>	: <i>Escherichia coli</i>
EAE	: Extracto de acetato de etilo
EET	: Extracto etanólico
EM	: Espectroscopía de masas
ESI	: <i>Electrospray ionization</i>
FDHs	: Fibroblastos dérmicos humanos
FGF	: <i>Fibroblast growth factor</i>
FRAP	: <i>Ferric reducing antioxidant power</i>
g ES	: gramos de extracto seco
G. 19-2	: Genotipo 19-2
G. ZF-18	: Genotipo ZF-18
G. ZF-18 ₂₀₁₃	: Genotipo ZF-18, hojas recolectadas en el año 2013
G. ZF-18 ₂₀₁₅	: Genotipo ZF-18, hojas recolectadas en el año 2015
GNPS	: <i>Global Natural Products Social Molecular Networking</i>
HAT	: <i>Hydrogen atom transfer</i>

HHDP	: <i>Hexahydroxydiphenoyl</i>
INIA	: Instituto Nacional de Investigaciones Agropecuarias
<i>K. pneumoniae</i>	: <i>Klebsiella pneumoniae</i>
MEC	: Matriz extracelular
mg EAG	: miligramos equivalentes de ácido gálico
mg EAT	: miligramos equivalentes de ácido tánico
mg EQ	: miligramos equivalentes de quercetina
MRSA	: Methicillin-resistant <i>Staphylococcus aureus</i>
<i>P. aeruginosa</i>	: <i>Pseudomona aeruginosa</i>
PBS	: Tampón fosfato salino
PDGF	: <i>Platelet derived growth factor</i>
RF-C	: Reactivo de Folin-Ciocalteu
<i>S. aureus</i>	: <i>Staphylococcus aureus</i>
SDS	: Dodecilsulfato de sodio
SET	: <i>Single electron transfer</i>
SFB	: Suero fetal bovino
TGF- β	: <i>Transforming growth factor beta</i>
TPCs	: Triterpenos pentacíclicos
t_r	: Tiempo de retención
TROLOX	: 6-hydroxy-2,5,7,8-tetramethylchroman-2-carboxylic acid
<i>U. molinae</i>	: <i>Ugni molinae</i>
UV	: Ultravioleta
VEGF	: <i>Vascular endothelial growth factor</i>

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1.	Datos de procedencia y criterios de selección de los genotipos de <i>U. molinae</i>	18
Tabla 2.	Protocolo de la cuantificación de fenoles totales mediante el ensayo de Folin-Ciocalteu.....	22
Tabla 3.	Protocolo de la cuantificación de flavonoides mediante el ensayo colorimétrico con AlCl ₃	26
Tabla 4.	Sistema de gradiente utilizado para la separación de compuestos fenólicos mediante CLAE-DAD.....	28
Tabla 5.	Características de las metodologías para determinar la actividad antioxidante mediante los métodos FRAP y apagamiento del radical DPPH.....	32
Tabla 6.	Protocolo para el ensayo antioxidante FRAP.....	33
Tabla 7.	Protocolo para el ensayo antioxidante de apagamiento del radical DPPH.....	34
Tabla 8.	Descripción, peso molecular (kDa) y diluciones de los anticuerpos primarios.....	48
Tabla 9.	Contenido fenólico total (CFT) y contenido de taninos totales (CTT) de los EETs y EAEs obtenidos de las hojas de murtila del año 2013 de distintos genotipos.....	54
Tabla 10.	Contenido de triterpenos pentacíclicos (TPCs) del EET y EAE de las hojas de murtila del G. ZF-18 ₂₀₁₅	64
Tabla 11.	Identificación tentativa de los compuestos presentes en el EET y EAE del G. ZF-18 ₂₀₁₅ mediante CL-EM.....	67
Tabla 12.	Resumen comparativo del análisis químico y de la actividad antioxidante de los EETs y EAEs de los genotipos ZF-18 ₂₀₁₃ , ZF-18 ₂₀₁₅ y 19-2.....	87

Tabla 13.	Valores de CL ₅₀ de los EETs y EAEs sobre fibroblastos dérmicos humanos obtenidos con las metodologías de exclusión con azul de tripán y el ensayo de alamarBlue™.....	95
Tabla 14.	Concentración inhibitoria mínima (CIM) de los EETs y EAEs obtenidos de hojas de murtila de los genotipos ZF-18 ₂₀₁₅ y 19-2.....	118
Tabla 15.	Resumen de la viabilidad de los fibroblastos dérmicos humanos tratados por 24 h con los EETs y EAEs de las hojas de murtila de los genotipos ZF-18 ₂₀₁₅ y 19-2.....	120
Tabla 16.	Resumen de los resultados obtenidos por los EETs y EAEs de los genotipos ZF-18 ₂₀₁₅ y 19-2 sobre distintas funciones de fibroblastos dérmicos humanos.....	121

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1.	Ramas con flores, hojas y frutos maduros de <i>Ugni molinae</i> Turcz.....	2
Figura 2.	Estructura química de algunos compuestos fenólicos identificados en las hojas de <i>Ugni molinae</i> Turcz.....	6
Figura 3.	Núcleo estructural de los principales triterpenos pentacíclico identificados en las hojas de <i>U. molinae</i>	7
Figura 4.	Fases del proceso de cicatrización.....	9
Figura 5.	Proceso de extracción seriada de las hojas de <i>Ugni molinae</i> de los distintos genotipos seleccionados.....	19
Figura 6.	Esquema de selección de los EETs y EAEs de las hojas de murtil para los estudios celulares con fibroblastos dérmicos humanos.....	21
Figura 7.	Esqueleto molecular de flavonas y flavonoles.....	25
Figura 8.	Redes moleculares (<i>molecular networking</i>).....	30
Figura 9.	Placa de cultivo con explantes de piel humana.....	36
Figura 10.	Protocolo para la determinación de viabilidad celular mediante exclusión con azul de tripán.....	39
Figura 11.	Protocolo para la determinación de la viabilidad celular de los FDHs con el reactivo de alamarBlue™.....	40
Figura 12.	Protocolo de migración celular evaluada mediante el ensayo de la herida (<i>Scratch assay</i>).....	42
Figura 13.	Protocolo del ensayo de adhesión celular de FDHs mediante tinción con cristal violeta.....	43
Figura 14.	Protocolo del ensayo de proliferación celular de FDHs evaluado mediante alamarBlue™.....	44
Figura 15.	Protocolo del tratamiento de los FDHs para cuantificar proteínas de la MEC mediante inmunodetección por Western blot.....	48

Figura 16.	Contenido fenólico total (CFT) y contenido de taninos totales (CTT) de los 10 EETs y EAEs obtenidos de las hojas de murtila del año 2013 de distintos genotipos.....	53
Figura 17.	Rendimiento comparativo de los extractos seriados de las hojas de murtila del G. ZF-18 ₂₀₁₃ y G. ZF-18 ₂₀₁₅	56
Figura 18.	Contenido fenólico total (CFT) y contenido de taninos totales (CTT) de los EETs y EAEs obtenidos de hojas de murtila del G. ZF-18 ₂₀₁₃ y G. ZF-18 ₂₀₁₅	59
Figura 19.	Concentración de flavonas y flavonoles en los EETs y EAEs de las hojas de murtila del G. ZF-18 ₂₀₁₃ y G. ZF-18 ₂₀₁₅	60
Figura 20.	Cromatogramas de triterpenos pentacíclicos del EAE G. ZF-18 ₂₀₁₅ obtenidos mediante CLAE-DAD (201 nm).....	62
Figura 21.	Ejemplo de derreplicación para la identificación de catequina.....	70
Figura 22.	Cromatogramas del perfil fenólico del EET y EAE del G. ZF-18 ₂₀₁₅ obtenidos mediante CLAE-DAD (280 y 360 nm).....	72
Figura 23.	Redes moleculares del EAE y EET de las hojas de <i>U. molinae</i> del genotipo ZF-18 ₂₀₁₅ analizadas en la plataforma GNPS y visualizadas con el software Cytoscape 3.6.1.	75
Figura 24.	Redes moleculares de las principales familias de compuestos presentes en EAE y EET de las hojas de <i>U. molinae</i> del G. ZF-18 ₂₀₁₅	79
Figura 25.	Valores FRAP de los EETs y EAEs de las hojas de murtila del G. ZF-18 ₂₀₁₃ y G. ZF-18 ₂₀₁₅	82
Figura 26.	DPPH remanente (%) luego de 90 min de reacción con el EET y el EAE del G. ZF-18 ₂₀₁₅ y el compuesto de referencia (TROLOX) a distintas concentraciones.....	83
Figura 27.	Concentración efectiva 50 (CE ₅₀) del EET y EAE del G. ZF-18 ₂₀₁₅	84
Figura 28.	Prueba de solubilidad de los EETs y EAEs de los genotipos 19-2 y ZF-18 ₂₀₁₅	89
Figura 29.	Obtención de fibroblastos dérmicos humanos a partir de explantes de piel.....	91

Figura 30.	Efecto del vehículo (DMSO 1%) sobre la viabilidad celular de FDHs a las 24 h, determinado mediante los ensayos de exclusión con azul de tripán y alamarBlue™.....	92
Figura 31.	Viabilidad celular de FDHs a las 24 h determinada mediante el ensayo de alamarBlue™.....	93
Figura 32.	Viabilidad celular de FDHs a las 24 h determinada mediante exclusión con azul de tripán.....	94
Figura 33.	Concentración Letal 50 (CL ₅₀) de los EETs y EAES de hojas de murtila de los genotipos ZF-18 ₂₀₁₅ y 19-2.....	96
Figura 34.	Migración de fibroblastos dérmicos humanos mediante el método de la herida <i>in vitro</i>	98
Figura 35.	Efecto de los EETs y EAES de los genotipos ZF-18 ₂₀₁₅ y 19-2 de hojas de murtila sobre la migración de FDHs	100
Figura 36.	Curva de calibración con cristal violeta para el ensayo de adhesión celular.....	102
Figura 37.	Efecto de los EETs y EAES de hojas de murtila de los genotipos ZF-18 ₂₀₁₅ y 19-2 sobre la adhesión de FDHs.....	103
Figura 38.	Estructuras químicas de TPCs con actividad cicatrizante.....	104
Figura 39.	Efecto a las 24 h de los EETs y EAES del G. ZF-18 ₂₀₁₅ y 19-2 sobre la proliferación de FDHs a distintas concentraciones de suero fetal bovino (SFB).	106
Figura 40.	Viabilidad celular de los FDHs a las 72 h.....	109
Figura 41.	Niveles de expresión de proteínas de la matriz extracelular y diferenciación de fibroblasto a miofibroblasto a las 72 h.....	114
Figura 42.	Contracción de geles de colágeno.....	117

ÍNDICE DE ANEXOS

- ANEXO 1.** Curvas de calibración con los tripterpenos pentacíclicos utilizados como compuestos de referencias para la cuantificación por CLAE-DAD.....136
- ANEXO 2.** Definiciones asociadas a derreplicación y creación de redes moleculares en la plataforma GNPS.....137
- ANEXO 3.** Acta de aprobación del proyecto para la utilización de fibroblastos dérmicos humanos por parte del Comité Ético Científico del Hospital Clínico de la Universidad de Chile.....138
- ANEXO 4.** Contenido de triterpenos pentacíclicos identificados en los EAEs obtenidos de las hojas de murtilla de distintos genotipos mediante CLAE-DAD (Arancibia-Radich et al., 2016).....140
- ANEXO 5.** Cromatograma CLAE-DAD de los triterpenos pentacíclicos del EET G. ZF-18₂₀₁₅ a una concentración de 10.000 ppm y longitud de detección de 201 nm.....141
- ANEXO 6.** Curvas de decaimiento (90 min) del radical DPPH a distintas concentraciones del EET y EAE de las hojas de murtilla del G. ZF-18₂₀₁₅.....142
- ANEXO 7.** Prueba de solubilidad de los EETs y EAEs de los genotipos ZF-18₂₀₁₅ y 19-2 en medio acuoso (DMSO 1%).....143
- ANEXO 8.** Comparación de triterpenos pentacíclicos de la *Centella asiatica* (extracto metanólico de comprimidos estandarizados) con triterpenoides de extractos de hojas murtilla, mediante CLAE-DAD ($\lambda = 205$ nm)..... 144

ANEXO 9.	Comparación de triterpenos pentacíclicos de la <i>Centella asiatica</i> (extracto metanólico de comprimidos estandarizados) con triterpenoides de extractos de hojas murtilla, mediante Cromatografía en Capa Fina (CCF).....	147
ANEXO 10.	Proceso de separación de taninos mediante precipitación con gelatina.....	148
ANEXO 11.	Fotografías de los testigos herbarios de los genotipos ZF-18 y 19-2 de <i>U. molinae</i> Turcz.....	149
ANEXO 12.	Publicaciones.....	150
ANEXO 13.	Presentaciones a congresos.....	151

RESUMEN

“Evaluación comparativa de la actividad cicatrizante cutánea de extractos concentrados en fenoles y en triterpenoides obtenidos de hojas de distintos genotipos de *Ugni molinae* Turcz.”

Ugni molinae Turcz. (Myrtaceae), conocida popularmente como murtillo o murta, es un arbusto nativo que posee una amplia distribución en el centro-sur de Chile. El pueblo Mapuche ha transmitido sus propiedades medicinales durante siglos, utilizando las infusiones de sus hojas como antiinflamatorias, astringentes y para el tratamiento de infecciones urinarias. Actualmente, además, se han elaborado diversos productos cosméticos hechos a bases de extractos de hojas de murtillo para el cuidado de la piel.

Diversos estudios han determinado que las hojas de murtillo presentan actividad antiinflamatoria, analgésica, antioxidante y antimicrobiana. Particularmente, en nuestro laboratorio se han realizado estudios comparativos entre extractos etanólicos (EETs) y de acetato de etilo (EAE) obtenidos a partir de hojas de murtillo de diferentes genotipos cultivados en el Instituto de Investigaciones Agropecuarias (INIA, Carillanca), determinando que la composición química de las hojas depende del genotipo. Entre los compuestos identificados en estos extractos se encuentran principalmente ácidos fenólicos, taninos, flavonoides y TPCs derivados del ursano, lupano y oleanano.

Debido a que los compuestos señalados anteriormente poseen un gran potencial para favorecer el proceso de cicatrización cutánea, el objetivo de este trabajo fue demostrar el efecto de EETs y EAEs, obtenidos desde las hojas de distintos genotipos de *U. molinae* y diferenciados por su composición química, sobre funciones de fibroblastos dérmicos humanos (FDHs) asociadas al proceso de cicatrización

Los genotipos seleccionados para el estudio fueron el G. 19-2 y G. ZF-18, cuyos EETs y EAEs presentaron diferencias estadísticamente significativas en su contenido de TPCs y de polifenoles. El G. ZF-18 destacó por presentar la mayor cantidad de compuestos fenólicos, por lo que fue seleccionado para realizar, por primera vez, un análisis comparativo de la composición química de sus extractos mediante derreplicación en la plataforma *open access* GNPS (*Global Natural Products Social Molecular Networking*), donde se identificaron tentativamente nuevos compuestos, como docosanol, avicularina, hiperósido, gospipentina y el disacárido trehalosa. Además, a través de la formación de

redes moleculares, se identificó que la principal familia de compuestos del EET y EAE del G. ZF-18 estaba conformada por heterósidos de flavonoles.

Se evaluó el efecto de los EETs y EAES sobre la funcionalidad de fibroblastos dérmicos aislados de piel humana, células fundamentales para las fases de proliferación y de remodelado del proceso de cicatrización. Los EETs y EAES de ambos genotipos obtuvieron resultados positivos sobre la proliferación y migración celular a las 24 h de tratamiento, sin embargo, el EET del G. ZF-18 obtuvo los mejores resultados ya que incrementó los niveles de proteínas de la matriz extracelular, como colágeno tipo I, colágeno tipo III y de fibronectina.

Finalmente, se concluyó que los EETs y EAES de los genotipos 19-2 y ZF-18 presentaron efectos positivos sobre funciones de fibroblastos dérmicos asociadas al proceso de cicatrización, como proliferación, adhesión y proliferación. Estos efectos dependieron de la composición química, siendo el extracto más activo el que presentó la mayor cantidad de polifenoles, principalmente de ácidos fenólicos y taninos hidrolizables (EET G. ZF-18). Los resultados de esta tesis aportaron nueva información respecto a los efectos farmacológicos de *U. molinae* y su correlación con la composición química de sus hojas.

ABSTRACT

"Comparative evaluation of the wound healing activity of extracts concentrated in phenols and triterpenoids obtained from leaves of different *Ugni molinae* Turcz. genotypes "

Ugni molinae Turcz. (Myrtaceae), known as murtilla or murta, is a native shrub that has a wide distribution in south-central Chile. The Mapuche people have transmitted its medicinal properties for centuries, using the infusions of its leaves as anti-inflammatory, astringent and for the treatment of urinary infections. Currently, in addition, various cosmetic products made from murtilla leaves extracts have been developed for skin care.

Various studies have determined that murtilla leaves have anti-inflammatory, analgesic, antioxidant and antimicrobial activity. In particular, in our laboratory, comparative studies have been carried out between ethanolic extracts (EETs) and ethyl acetate extracts (EAEs) from murtilla leaves of different genotypes cultivated at the Instituto Nacional de Investigaciones Agropecuarias (INIA, Carillanca), determining that the chemical composition of the leaves depends on the genotype. Among the compounds identified in these extracts are mainly phenolic acids, tannins, flavonoids and pentacyclic triterpenes (PCTs) derived from ursan, lupane and oleanan nuclei.

The compounds mentioned above have great potential to promote the wound healing process, so the objective of this work was to demonstrate the effect of EETs and EAEs, obtained from the leaves of different of *U. Molina* genotypes and differentiated by their chemical composition, on functions of human dermal fibroblasts (HDFs) associated with the wound healing.

The genotypes selected for the study were G. 19-2 and G. ZF-18, whose EETs and EAEs showed statistically significant differences in their content of PCTs and polyphenols. G. ZF-18 stood out for presenting the highest polyphenolic content, so it was selected to perform, for the first time, a comparative analysis of the chemical composition of its extracts by dereplication using the open access platform GNPS (Global Natural Products Social Molecular Networking). New compounds were tentatively identified, such as docosanol, avicularin, hyperoside, gosipentin and the disaccharide trehalose. Furthermore, by molecular networking, it was identified that the main family of compounds between the EET and EAE of G. ZF-18 was made up of flavonol glycosides.

The effect of EETs and EAEs on the functionality of dermal fibroblasts isolated from human skin, fundamental cells for the proliferative and remodeling phases of the wound healing process, was evaluated. The EETs and EAEs of both genotypes obtained positive results on cell proliferation, adhesion and migration at 24 h of treatment, however, the EET of G. ZF-18 obtained the best results since it increased the protein levels of the extracellular matrix, as collagen type I and III, and fibronectin.

Finally, it was concluded that EETs and EAEs of genotypes 19-2 and ZF-18 presented positive effects on dermal fibroblast functions associated with wound healing, such as proliferation, adhesion and proliferation. These effects depended on the chemical composition, being the most active extract the one that presented the highest phenolic content, mainly phenolic acids and hydrolyzable tannins (EET G. ZF-18). The results of this thesis provided new information regarding the pharmacological effects of *U. molinae* and its correlation with the chemical composition of its leaves.

I. INTRODUCCIÓN

El uso de plantas medicinales tiene un origen ancestral en la historia de la humanidad y ha sido resultado del conocimiento empírico de la relación entre las comunidades locales y su ecosistema (Torri 2010). Según la OMS (Organización Mundial de la Salud), entre el 65% y el 80% de las poblaciones de países en vías de desarrollo utilizan actualmente plantas medicinales para tratar enfermedades. Sin embargo, de las más de 300.000 especies de plantas que existen en el mundo, solo el 15% ha sido evaluado con estudios científicos para determinar su potencial farmacológico (Palhares et al., 2015). En Chile, la Medicina Tradicional Mapuche es una de la más importantes entre los pueblos originarios, caracterizada por el hecho de que las plantas medicinales tienen un rol integral y holístico para su cultura, pudiendo ser utilizadas con fines diagnósticos, terapéuticos y preventivos (Torri 2010).

Entre estas especies vegetales utilizadas con fines medicinales por las comunidades Mapuche se encuentra *Ugni molinae* Turcz (Myrtaceae), un arbusto silvestre conocido popularmente como “murtilla”, “murta” o “uñi” (Avello et al., 2009a). Posee una amplia distribución en el centro-sur de Chile, desde la VI a la X Región en el río Palena, encontrándose principalmente hacia la Cordillera de la Costa. Crece preferentemente en quebradas donde existe mayor humedad, aunque también es frecuente encontrarlo a la orilla de los bosques y en terrenos abiertos y degradados. El arbusto posee una copa siempreverde, puede alcanzar los 2 metros de altura en condiciones de mayor pluviosidad y sus hojas, de 2 a 2,5 cm, son pecioladas, opuestas, de ápice en forma de lanza y se caracterizan por ser brillantes, de color verde oscuro en la epidermis superior y más claro en la epidermis inferior. Los frutos de murta son bayas redondeadas y rojizas, de 6 mm de diámetro en promedio y contienen una gran cantidad de semillas (Montenegro, 2002) (**Figura 1**). Se caracterizan por poseer un agradable sabor y aroma y han sido utilizados tanto para el consumo fresco como para la fabricación artesanal de mermeladas, jarabes, postres y licores (Seguel et al., 2000). En la última década, la murtilla ha adquirido un

gran valor comercial gracias a sus frutos, los cuales se han posicionado de manera importante en la exportación de berries en la industria frutícola del país (Seguel et al., 2015).

Los indígenas chilenos han transmitido y aprovechado las propiedades cosméticas y beneficiosas para la salud de la murtila durante siglos. Bebidas alcohólicas e infusiones hechas de sus hojas son comúnmente utilizadas para el tratamiento de dolores del tracto urinario, como astringentes, estimulantes (Rubilar et al., 2006), antiinflamatorias y analgésicas (Delporte et al., 2007). Además, durante el último tiempo han aparecido diversos productos cosméticos en el mercado nacional hechos a base de extractos glicólicos de hojas murtila, utilizados principalmente para el cuidado de la piel.



Figura 1. Ramas con flores, hojas y frutos maduros de *Ugni molinae* Turcz. (Fuente URL: <https://fundacionphilippi.cl/catalogo/ugni-molinae/>)

1.1. Estudios químicos y farmacológicos de *Ugni molinae* Turcz

Debido a su potencial medicinal y al gran auge comercial que ha tenido la murtila en nuestro país, diversos estudios se han realizado con el fin de caracterizar química y farmacológicamente a esta planta. Respecto a sus hojas, se ha comprobado que extractos polares de éstas son una importante fuente de compuestos polifenólicos con capacidad antioxidante tanto *in vitro* como *in vivo*, presentando actividad en los ensayos de DPPH,

TBARS, ORAC y CUPRAC (Rubilar et al., 2006; Rubilar et al., 2011; Avello et al., 2013; Hauser et al., 2014). También se ha estudiado la actividad analgésica y antiinflamatoria tópica de extractos seriados de las hojas, efectos atribuidos a la presencia de polifenoles y de triterpenos pentacíclicos (Delporte et al., 2007; Aguirre et al., 2006; Goity et al., 2013; Arancibia-Radich et al., 2016). Se ha comprobado, además, la actividad antimicrobiana frente a microorganismos de importancia clínica (Avello et al., 2009a, Shene et al., 2009; Shene et al., 2012) y frente a microorganismos que contaminan alimentos y productos cosméticos (Hauser et al., 2014, Avello et al., 2009b), concluyendo que los extractos etanólicos de hojas de murta podrían ser útiles como agentes preservantes. Por otro lado, diversos autores han comprobado el efecto inhibitor de importantes enzimas que participan en la absorción de la glucosa, como la α -amilasa, α -glucosidasa (Rubilar et al., 2011) y glicógeno fosforilasa a (GPa) (Göity, 2013; Queupil, 2011, Peña 2011; Bugeño 2011), dando una proyección al uso de las hojas para el tratamiento de Diabetes Mellitus tipo II. Finalmente, los últimos estudios con hojas de murtillo han demostrado que extractos etanólicos y de acetato de etilo tienen un efecto positivo sobre marcadores neuropatológicos asociados a la enfermedad de Alzheimer (Jara-Moreno et al., 2018; Jara-Moreno et al., 2020).

Un importante aporte a los estudios con murtillo lo ha realizado el Instituto Nacional de Investigaciones Agropecuarias (INIA) a través de la genotipificación de 100 accesiones de murta, recolectadas en diferentes localidades del centro-sur de Chile, específicamente entre la VII a la X Región. A través de la técnica molecular de ADN polimórfico amplificado al azar (RAPD) se determinó que la población de *U. molinae* presenta una alta variabilidad genética, característica que permitió crear un banco de germoplasma y mejorar los atributos comerciales de la planta por medio del cultivo individual de cada genotipo en condiciones agronómicas y edafoclimáticas controladas (Seguel et al., 2000). Con el financiamiento del Proyecto Fondecyt 1130155, se comenzó a estudiar en nuestro laboratorio la influencia del genotipo sobre la actividad farmacológica de extractos seriados de hojas de murtillo y su correlación con la composición química. A partir de

hojas de 10 genotipos diferentes de murta se obtuvieron los extractos seriados de hexano (EH), de diclorometano (EDCM), de acetato de etilo (EAE) y de etanol (EET), los cuales concentran diferentes grupos de compuestos dependiendo de su polaridad. Los estudios realizados en nuestro laboratorio han demostrado que existen diferencias en los resultados de diferentes ensayos dependiendo del genotipo de las hojas. Así, algunos genotipos de murta destacaron respecto a su capacidad antioxidante, evaluada mediante los ensayos DPPH, FRAP y ORAC (Peña-Cerda et al., 2017), a su capacidad inhibitoria frente a α -glucosidasa y la proteína tirosina fosfatasa 1B (Veas et al., 2015; Bugueño et al., 2015) y respecto a su contenido de fenoles totales (CFT) y concentración de flavonoides (Peña-Cerda et al., 2017; Arancibia-Radich et al., 2016). Cabe destacar que los extractos analizados fueron los EETs y EAEs ya que estos concentran la mayor cantidad de compuestos bioactivos y corresponden a los genotipos: 8-2, 14-4, 19-1, 19-1ha, 19-2, 22-1, 23-2, 27-1, 31-1 y ZF-18.

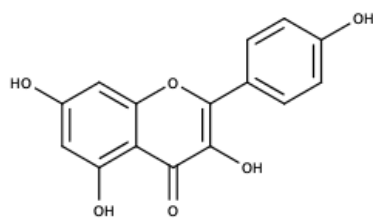
Respecto a los compuestos que se han identificado en las hojas de murta, se encuentran dos grandes grupos: los polifenoles y los triterpenos pentacíclicos (TPCs). En primer lugar, los compuestos fenólicos corresponden a uno de los grupos más importantes de metabolitos secundarios en las plantas y son conocidos debido a su amplio espectro de propiedades biológicas, principalmente por su efecto antioxidante. Se han identificado más de 8000 estructuras diferentes y se clasifican comúnmente como flavonoides y compuestos fenólicos no flavonoides. Los primeros poseen una estructura base de dos anillos aromáticos conectados por un puente de tres carbonos ($C_6-C_3-C_6$), mientras que en el segundo grupo se encuentran compuestos de estructura más heterogénea, como los ácidos fenólicos, lignanos, estilbenos y un grupo de polifenoles que forman grandes polímeros entre ellos, los taninos (Dzialo et al., 2016).

Entre los compuestos polifenólicos identificados en extractos acuosos, etanólicos, metanólicos y de acetato de etilo de hojas de murta (**Figura 2**) se encuentran principalmente flavonoles como quercetina, canferol, miricetina y sus heterósidos; flavan-

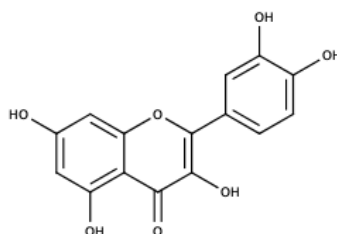
3-oles como catequina y epicatequina; taninos gálicos como galoil- y trigaloil-glucosa; taninos elágicos derivados del núcleo hexahidroxidifenoilo (HHDP) y algunos ácidos fenólicos como los ácidos gálico, elágico y quínico (Rubilar et al., 2006; Rubilar et al., 2011; Avello et al., 2012; Shene et al., 2012; Avello et al., 2014; Peña-Cerda et al., 2017; Jara-Moreno et al., 2018; Jara-Moreno et al., 2020).

En relación a los TPCs, éstos corresponden a compuestos constituidos por un esqueleto base de 30 carbonos originados del escualeno. De acuerdo a su biogénesis, son agrupados dependiendo de su núcleo estructural, encontrándose triterpenos derivados del ursano, oleanano, lupano, serratano y onocerano. La relevancia farmacológica de los TPCs ha sido demostrada tanto *in vitro* como *in vivo*, determinando que poseen propiedades antiinflamatorias, antibacterianas, antitumorales, entre otras (Furtado et al., 2017).

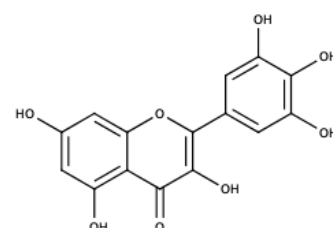
Entre los TPCs que se han identificado en las hojas de murtila se encuentran compuestos derivados de los núcleos del lupano, ursano y oleanano (**Figura 3**), como el ácido alfitólico y ácido betulínico (derivados del lupano); ácido maslínico y ácido oleanólico (derivados del oleanano) y los ácidos asiático, madecásico, corosólico y ursólico (derivados del ursano) (Aguirre et al., 2006; Goity et al., 2013). Estos compuestos también han sido identificados y cuantificados en los EETs y EAEs de los 10 genotipos de murtila, determinando que se encuentran en mayor concentración en los EAEs que en los EETs. Respecto a la cuantificación de ácido asiático, por ejemplo, el promedio fue de 9,1 g/100 g de extracto seco en los EAEs, los cuales obtuvieron las mayores concentraciones de este triterpenoide (Arancibia-Radich et al., 2016).



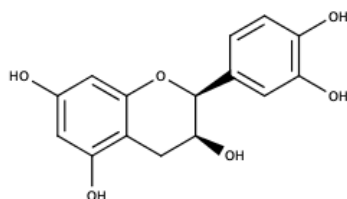
Canferol



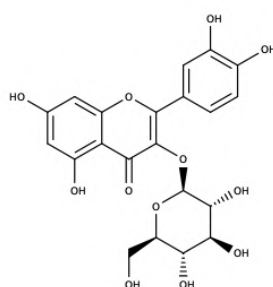
Quercetina



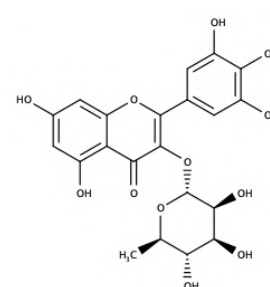
Miricetina



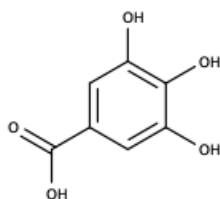
Epicatequina



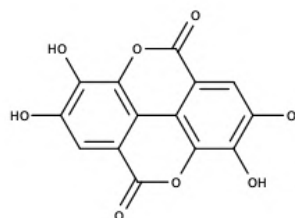
Isoquercitrina



Miricitrina



Ácido gálico



Ácido elágico

Figura 2. Estructura química de algunos compuestos fenólicos identificados en las hojas de *Ugni molinae* Turcz.

Algunos de los compuestos señalados anteriormente son de gran relevancia para la formulación de productos tópicos con fines cosméticos y dermatológicos, como el extracto titulado de *Centella asiatica* o TECA[®], el cual está conformado por tres moléculas triterpénicas: asiaticósido, ácido asiático y ácido madecásico. Esta mezcla de compuestos

triterpénicos se comercializa bajo la firma farmacéutica de Bayer S.A y se utiliza para fabricar distintos productos, entre ellos la crema cicatrizante Madecassol (F-1190/13).

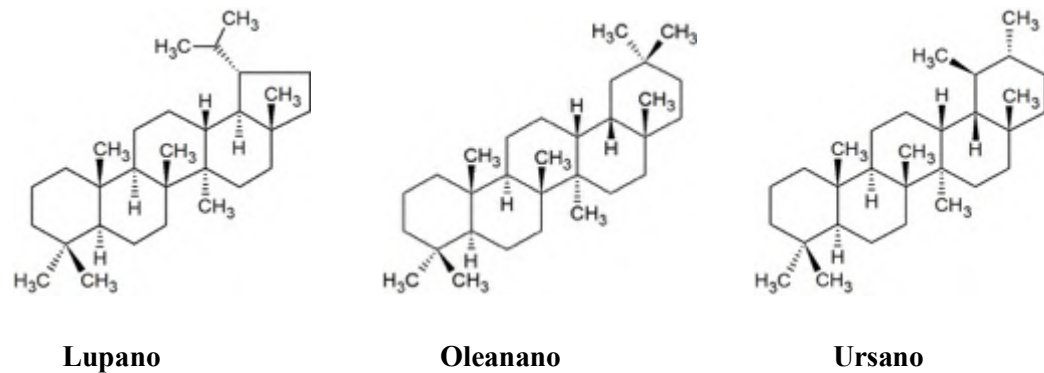


Figura 3. Núcleo estructural de los principales triterpenos pentacíclicos identificados en las hojas de *U. molinae*

Ambos grupos de compuestos, tanto polifenoles como TPCs, han demostrado poseer actividad cicatrizante en modelos *in vitro* e *in vivo*, por lo que existen diferentes blancos a través de los cuales los extractos de hojas de murtila podrían mejorar el proceso de cicatrización cutánea debido al potencial efecto de estos compuestos bioactivos.

1.2. Fisiología de la cicatrización cutánea

La ruptura de la integridad de la piel, de la superficie de las mucosas o del tejido de un órgano resulta en la formación de una herida. En Chile, las estadísticas disponibles al año 2008 muestran alrededor de 160.000 pacientes portadores de algún tipo de herida o úlcera, clasificadas en la 1° Encuesta Epidemiológica Nacional de Heridas y Úlceras en los siguientes grupos: 77,2% corresponde a la clasificación general de heridas, 14% a quemaduras y un 8,8% a úlceras de pie diabético (Aburto y Morgado, 2010). Las heridas se pueden producir como parte del proceso de una enfermedad, de forma accidental o intencional, pero sin importar su etiología, el proceso de reparación es similar (Harper et al., 2014).

El proceso de cicatrización se caracteriza por ocurrir en etapas secuenciales (**Figura 4**), dividiéndose clásicamente en cuatro fases: hemostasis, inflamación, proliferación y remodelado. La primera etapa tiene por finalidad detener el sangrado a través de la formación de un coágulo de fibrina y plaquetas (Morton y Phillips, 2015). Cuando existe una exposición de colágeno en el tejido dañado se estimula la activación, adhesión y agregación de las plaquetas, las cuales tienen un rol fundamental al inicio del proceso de cicatrización. Estas células se encargan de liberar factores de crecimiento como el factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF), el cual ejerce una acción quimiotáctica para los macrófagos y promueve la proliferación de fibroblastos (Yamada et al., 2018). El factor de crecimiento epidérmico (EGF) también se libera de las plaquetas y actúa principalmente como señal de proliferación de queratinocitos. Otros factores de crecimiento y quimiocinas secretados por las plaquetas incluyen la quimiocina CXC ligando-4 (CXCL-4), el factor de plaquetas 4 (PF4) y el factor de crecimiento transformante β (TGF- β), los cuales se encargan del reclutamiento de células inflamatorias, de promover la migración de queratinocitos y la síntesis y remodelación de matriz extracelular (MEC) mediada por los fibroblastos dérmicos (Opneja et al., 2019).

Durante la fase inflamatoria, los neutrófilos se adhieren al endotelio en los primeros minutos de la lesión. Para ello, utilizan elastasa y colagenasa con el fin de degradar la MEC y facilitar su migración al sitio de la herida donde se encargan de fagocitar a los microorganismos colonizadores o los restos celulares. La fase inflamatoria normalmente persiste hasta que se elimina por completo la infiltración de neutrófilos y se da lugar a la emigración de macrófagos en la zona de la herida (Harper et al., 2014).

Los macrófagos llegan a la herida durante los primeros tres días, encargándose de fagocitar a los neutrófilos y de estimular la formación de tejido granular. La fagocitosis de neutrófilos inicia una cascada de eventos donde comienza a disminuir la producción de citocinas proinflamatorias y se produce la transición de los macrófagos M1 al fenotipo reparador M2. Se ha demostrado que factores paracrinos liberados por macrófagos M2

tienen un mayor efecto sobre la proliferación de fibroblastos dérmicos que los factores solubles liberados por el fenotipo M1. Estos procesos forman parte de la resolución oportuna de la inflamación y la transición a la fase proliferativa del proceso de cicatrización (Opneja et al., 2019).

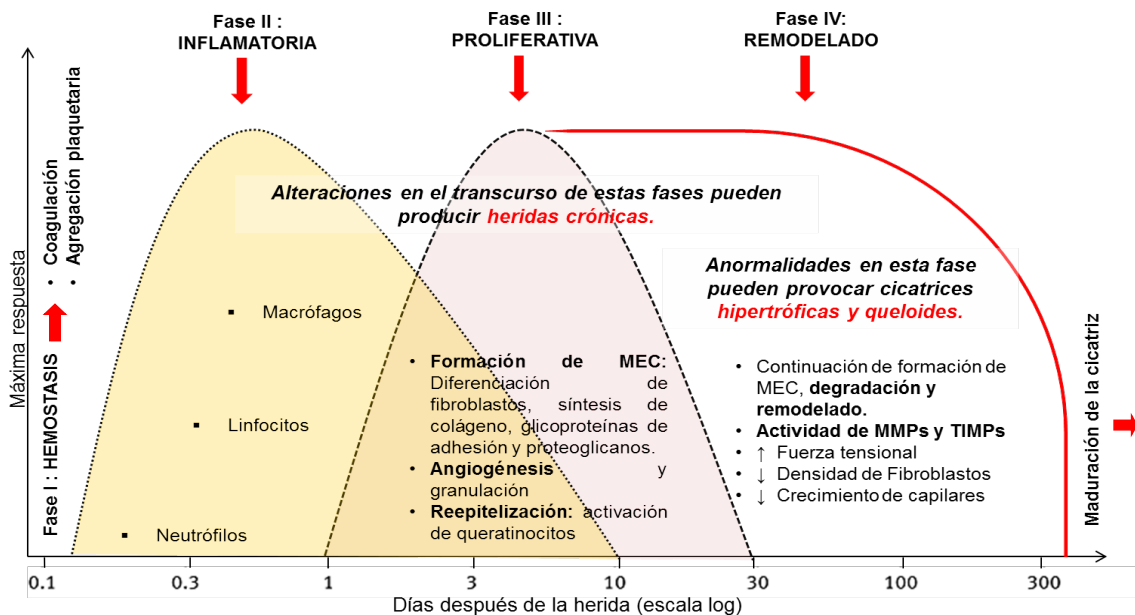


Figura 4. Fases del proceso de cicatrización (adaptado al español de: Enoch y Leaper 2005)

La etapa proliferativa comienza luego de 24 h después de la lesión y se compone de distintos procesos, entre los que se encuentran: reepitelización, neovascularización y formación de tejido granular. La formación temprana de la matriz de fibrina y la liberación de TGF- β 1 permiten que los queratinocitos migren desde el borde de la herida y de los folículos pilosos hacia el lecho de la herida (Morton y Phillips, 2015). Por su parte, la neovascularización o angiogénesis es crucial para la mantención del tejido en formación, ya que lo provee de nutrientes y de intercambio gaseoso. Los factores VEGF (Factor de crecimiento endotelial vascular), PDGF, FGF y trombina que se encuentran presentes en el sitio de la herida, se unen a los receptores de las células endoteliales de los vasos sanguíneos existentes e inician la formación de brotes vasculares, los cuales migran hacia

el lecho de la herida gracias a la ayuda de MMPs (metaloproteinasas de la matriz), diferenciándose posteriormente en nuevos vasos sanguíneos (Sanon et al., 2016).

En respuesta a los factores de crecimiento sintetizados por los macrófagos, como PDGF, FGF, VEGF, TGF- α y TGF- β , los fibroblastos dérmicos comienzan a migrar, proliferar y a producir los componentes de la MEC, tales como glucosaminoglicanos, proteoglicanos y colágeno, un evento crítico en la fase de proliferación. En esta etapa se reemplaza el coágulo de fibrina y se reemplaza en tejido granuloso. El colágeno se secreta al espacio extracelular en forma de procolágeno, luego se produce la escisión de sus segmentos terminales para formar el tropocolágeno, el cual puede agregarse con otras moléculas de tropocolágeno para formar filamentos que son ricos en hidroxilisina e hidroxiprolina. Estos aminoácidos modificados le permiten al colágeno formar fuertes enlaces cruzados que aumentan su resistencia. Las fibras de colágeno se depositan en una matriz de fibronectina que también sirve como ancla para los miofibroblastos y para promover la adhesión de queratinocitos (Qing 2019).

La liberación de TGF- β induce la diferenciación de fibroblastos a miofibroblastos (Werner y Antsiferova, 2016). Estas células diferenciadas expresan la proteína α -actina del músculo liso (α -SMA), la cual corresponde a su marcador celular más común. La expresión de α -SMA le confiere a los fibroblastos una mayor actividad contráctil (al menos el doble) comparada con cultivos de fibroblastos sin expresión de α -SMA (Shinde et al., 2017), por lo que cumplen un importante rol para contraer y cerrar la herida alrededor del séptimo día después de la lesión (Werner y Antsiferova, 2016).

Luego de la apoptosis de los miofibroblastos, éstos son reemplazados por una segunda ola de fibroblastos que inician la fase de remodelación, la cual se caracteriza por la reorganización activa de la MEC y una reducción en el número total de capilares (Stunova y Vistejnova, 2018). El tejido intacto se compone en un 80 a un 90% de colágeno de tipo I y en un 10 a un 20% de colágeno de tipo III, a diferencia de la matriz colágena de la

herida inicial, la cual consta en un 30% de colágeno de tipo III. Este colágeno se caracteriza por poseer fibras más finas y más elásticas que se disponen paralelamente, sin entrelazarse, por lo que la matriz inicial es más débil (Teller y White, 2009). En la etapa de remodelación se aumenta la síntesis y depósito del colágeno tipo I, mientras que se produce la degradación del colágeno tipo III por medio de la acción de MMPs y de sus inhibidores TIMPs (inhibidores tisulares de metaloproteinasas) con el objetivo de aumentar la fuerza tensional de la piel y generar una cicatriz más resistente. Durante el proceso de remodelado, la fuerza tensional del tejido aumenta continuamente, pero sólo alcanza un máximo de un 70-80% del valor de la piel no dañada. La elasticidad del nuevo tejido también es significativamente menor comparada con el tejido no dañado y, además, la cicatriz resultante no posee folículos pilosos ni glándulas sebáceas ni sudoríparas debido a que estas estructuras no se pueden regenerar (Werner y Antsiferova, 2016). Cuando se completa esta última etapa, la cual puede durar varios años, se da por finalizado el proceso de cicatrización

1.3. Productos naturales y sus derivados con actividad cicatrizante

Generalmente, las heridas agudas pasan las fases descritas anteriormente en un tiempo relativamente rápido y sanan sin complicaciones. Sin embargo, se ha demostrado que las heridas que presentan un retraso de más de 12 semanas en la cicatrización desde el daño inicial, se convierten en una herida crónica (Harper et al., 2014). Este tipo de herida no sigue con normalidad las etapas del proceso de cicatrización, por lo que quedan atrapadas en una fase inflamatoria crónica que perjudica la restauración funcional y anatómica del tejido dañado. Entre las causas que provocan que la cicatrización no curse normalmente las distintas fases del proceso se encuentran: el envejecimiento, infecciones bacterianas, tratamientos farmacológicos con AINEs (antiinflamatorios no esteroideos) o quimioterapia y enfermedades sistémicas de tipo metabólicas, vasculares o autoinmunes (Werner y Antsiferova, 2016), entre otras. Debido a que estos múltiples factores pueden afectar la cicatrización normal de una herida y a que los tratamientos que existen en la

actualidad no satisfacen por completo todos los requerimientos para una reparación óptima del tejido dañado, muchos estudios han considerado la aplicación de productos naturales para mejorar el proceso de cicatrización, los cuales han sido utilizados por cientos de años en la medicina tradicional (Kon y Rai, 2014). Las especies vegetales más comunes que se utilizan con fines dermatológicos (como extractos concentrados en su mayoría) corresponden a: *Hamamelis virginiana*, *Ginkgo biloba*, *Arnica montana*, *Matricaria recutita* (n.v. manzanilla), *Aloe vera*, *Calendula officinalis*, *Centella asiatica*, *Aesculus hippocastanum* (n.v. castaño de Indias) y *Buddleja globosa* (n.v. matico) (Faghihi y Radan, 2011; Shenefelt, 2011). El valor medicinal de estos productos se debe a sus componentes bioactivos y los efectos cicatrizantes se asocian principalmente a compuestos como taninos, flavonoides y terpenoides (Thakur et al., 2011).

En relación a los compuestos fenólicos, se ha demostrado que tienen un importante efecto en la prevención o atenuación de síntomas de desórdenes cutáneos y en la reducción del tiempo de cicatrización (Dzialo et al., 2016). En la medicina tradicional se han utilizado plantas ricas en taninos para el tratamiento de diferentes patologías, entre ellas, la cicatrización de heridas, quemaduras e inflamación (Leal et al., 2015). Lai et al. (2016) demostró que la aplicación tópica de hidrogeles con extractos ricos en taninos, obtenidos de las hojas de *Blechnum orientale*, aumentó la proliferación de fibroblastos, la síntesis de colágeno y la angiogénesis en úlceras de ratas diabéticas. Los efectos de los taninos, en parte, se explican por la propiedad que tienen de formar complejos con proteínas o polisacáridos en el sitio dañado, formando una capa protectora sobre el tejido epitelial que favorece la cicatrización (Leal et al., 2015). Se demostró, también, que el colágeno tratado con EGCG (epigallocatequina-3-galato), aumentó su estabilidad estructural, resultando en una mayor resistencia a la degradación de colagenasas bacterianas y de la MMP-1. El colágeno tratado con EGCG proporcionó un soporte favorable para la adhesión celular de un cultivo de fibroblastos y favoreció la expresión de fibronectina (Goo et al., 2003).

Por otro lado, mediante un ensayo *in vivo* de escisión en ratas Wistar, se demostró que la aplicación tópica de quercetina incrementaba el cierre de la herida de una manera dosis-dependiente. Además, las ratas tratadas con este flavonoide presentaron un incremento en los niveles de TGF- β 1 y de VEGF, disminución de células del sistema inmune, mayor proliferación de fibroblastos y una mejor reepitelización del tejido en comparación al control (Gopalakrishnan et al., 2016).

Como se nombró anteriormente, dentro de la composición química de las hojas de murtila se encuentran diferentes TPCs que poseen actividad cicatrizante. Entre ellos, el ácido asiático y el ácido madecásico son ampliamente conocidos debido que son unos de los compuestos activos de la *Centella asiatica*. Se ha demostrado que estos TPCs aumentan la síntesis de colágeno tipo I en cultivos primarios de fibroblastos humanos (Maquart et al., 1990; Bonte et al., 1993). En modelos animales de herida de incisión y quemadura, se demostró que diferentes extractos obtenidos de las hojas de *C. asiatica* aplicados tópicamente mejoraron la fuerza tensional de la herida y el grado de cicatrización de la quemadura en comparación al vehículo utilizado, siendo el extracto acetato de etilo, que contenía ácido asiático, el que obtuvo los mejores resultados (Somboonwong et al., 2012). También, se han realizado análisis a nivel de cambios en la expresión génica en fibroblastos humanos dérmicos, concluyendo que el asiaticósido, el ácido asiático y el ácido madecásico activan TNFAIP6, un gen que codifica una proteína cuyo rol es importante para la estabilidad de la matriz extracelular y la migración celular. Además, se comprobó que estos compuestos aumentan los niveles transcripcionales de TGF- β , el cual tiene un efecto directo sobre el aumento de los niveles de colágeno, siendo significativamente mayor con ácido asiático (Coldren et al., 2003).

Moura-Letts et al. (2006) demostró que las hojas y tallos de *Anredera diffusa* presentaron actividad cicatrizante, evaluada a través de la medición de la resistencia a la ruptura de la cicatriz en un modelo animal de incisión. El fraccionamiento bioguiado de la planta permitió concluir que el ácido oleanólico correspondía al principal componente asociado

al efecto cicatrizante, determinando que la actividad máxima de este triterpeno aislado, aplicado tópicamente, fue de 40 µg de ácido oleanólico por g de peso corporal de los ratones. Por su parte, Both et al. (2002) realizó estudios sobre líneas celulares de fibroblastos dérmicos utilizando liposomas cargados con ácido ursólico (0,3 y 1,0% p/p), demostrando que este TPc aumentaba 70 veces los niveles de procolágeno respecto a los niveles de procolágeno en las células no tratadas.

1.4. Murtilla y cicatrización

Varios de los compuestos mencionados con efecto cicatrizante se han identificado en la murtilla, por lo que se postula que sus hojas poseen un efecto positivo sobre la funcionalidad de fibroblastos dérmicos, dándole un potencial a esta especie vegetal para mejorar el proceso de cicatrización de heridas cutáneas. Como antecedente previo, Lobos (2006) en nuestro Laboratorio demostró que extractos de hojas de murtilla silvestre aumentaron significativamente el colágeno tipo I y la fibronectina en cultivos primarios de fibroblastos humanos, siendo el EAE a una concentración de 5,0 µg/mL el que obtuvo el mayor efecto. Además, actualmente un grupo de investigadoras de la Universidad Andrés Bello desarrollaron un parche con propiedades cicatrizantes hecho a base de extractos de hojas de murtilla y nalca (Rivera, 2019), el cual redujo los tiempos de curación de heridas en modelos *in vivo*, sin embargo, aún no existen estudios que expliquen el o los posibles mecanismos cicatrizantes de estas plantas nativas.

Es importante reiterar que a través de los distintos estudios desarrollados en nuestro laboratorio se ha llegado a la conclusión de que el genotipo influye en la composición química de las hojas, por lo que se han encontrado diferencias significativas entre las concentraciones de los compuestos identificados para cada uno de los genotipos de *U. molinae* estudiados, tanto para los compuestos fenólicos como para los TPCs. De acuerdo a esto y a la información presentada anteriormente, el objetivo de esta tesis doctoral fue seleccionar EETs y EAEs de murtilla distintos genotipos diferenciados por su composición química, con el fin de evaluar comparativamente sus efectos sobre distintas

funciones de fibroblastos dérmicos asilados de piel humana asociadas a cicatrización, específicamente sobre la proliferación, adhesión, migración, diferenciación celular y producción de proteínas de la matriz extracelular mediante western blot. Además, con el genotipo que presentó la mayor cantidad de polifenoles, se realizó por primera vez un análisis comparativo de la composición química del EET y EAE mediante dereplicación y redes moleculares utilizando la plataforma *open access Global Natural Products Social Molecular Networking* (GNPS).

Debido a la importancia los fibroblastos dérmicos en las etapas de proliferación y de remodelado en el proceso de cicatrización, los resultados de esta tesis aportan nueva información respecto a los efectos farmacológicos de genotipos seleccionados de *U. molinae*, dando una posible explicación del mecanismo cicatrizante de esta planta nativa y correlacionando sus efectos con la composición química de sus hojas. En base a los antecedentes anteriormente expuestos, formulamos la siguiente hipótesis:

II. HIPÓTESIS

Los extractos de acetato de etilo y etanólicos obtenidos desde las hojas de distintos genotipos de *U. molinae* Turcz. aumentan la proliferación, adhesión, migración y diferenciación celular y la producción de proteínas de la matriz extracelular en fibroblastos dérmicos humanos. Estos efectos dependen de la composición triterpénica y fenólica de los EAAs y EETs, respectivamente.

III. OBJETIVO GENERAL

Demostrar que los EAAs y EETs obtenidos de hojas de *U. molinae* de diferentes genotipos y diferenciados por su composición fenólica y de triterpenos pentacíclicos incrementan funciones de fibroblastos dérmicos humanos asociadas a cicatrización.

IV. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Determinar las diferencias en el contenido de fenoles y taninos totales entre los EETs y EAEs de los 10 genotipos de murtilla.
2. Determinar la composición química y actividad antioxidante del EET y EAE de un genotipo seleccionado por presentar un alto contenido de polifenoles.
3. Evaluar el efecto de dos EETs con diferente contenido de fenoles y de taninos totales (grupo 1) y dos EAEs con diferente contenido de triterpenos pentacíclicos (grupo 2) sobre la viabilidad de fibroblastos dérmicos humanos.
4. Comparar los efectos de los EETs del grupo 1 y EAEs del grupo 2 sobre procesos asociados a la cicatrización de fibroblastos dérmicos humanos (FDHs):
 - a) Efecto sobre la migración celular
 - b) Efecto sobre la adhesión celular
 - c) Efecto sobre proliferación celular
 - d) Efecto sobre la diferenciación de fibroblasto a miofibroblasto
 - e) Efecto sobre la síntesis de colágeno tipo I y III
 - f) Efecto sobre la síntesis de fibronectina
 - g) Efecto sobre la contracción de geles de colágeno

V. MATERIALES Y MÉTODOS

5.1. MATERIALES

Los patrones de triterpenos pentacíclicos para las curvas de calibración con los ácidos asiático, ursólico y oleanólico, así como los patrones de fenoles correspondientes a quercetina, ácido gálico y ácido tánico y los reactivos 2,4,6-tripiridiltriazina (TPTZ), ácido 6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcromano-2-carboxílico (trolox), 2,2-difenil-1-picrilhidrazilo (DPPH); fueron adquiridos de Sigma Aldrich (St. Louis, MO). Los reactivos de Folin-Ciocalteu, FeCl₃, AlCl₃, Na₂HPO₄ x 7H₂O, KH₂PO₄, CH₃COONa, Na₂CO₃, FeSO₄ x 7H₂O y los solventes de calidad HPLC fueron adquiridos de Merck (Darmstadt, Alemania).

Colagenasa tipo II (CAS 9001-12-1), tinción de azul de tripán (CAS 15250-061), alamarBlue™, colágeno tipo I de cola de rata y el anticuerpo primario anti-fibronectina fueron comprados a Life Technologies Corporation (CA, EEUU). Los anticuerpos primarios anti-COL1A1 (E8I9Z) rabbit, anti- α -SMA (D4k9N) XP® rabbit y los anticuerpos secundarios GAPDH (14C10) y beta-tubulina (#2416s) fueron adquiridos de Cell Signaling Technology (CST) (MI, EEUU). El anticuerpo primario anti-colágeno III (EPR17673) fue adquirido de Abcam (Cambridge, UK), TGF- β 1 de R&D Systems y el medio de cultivo DMEM/F-12 de Gibco®. Suero fetal bovino (SFB), tripsina/EDTA, estándar de peso molecular y compuestos orgánicos e inorgánicos fueron adquiridos de Merck Millipore (Darmstadt, Alemania). El reactivo de Bradford para la cuantificación de proteínas y los filtros de nitrocelulosa estériles 0,22 μ m (Whatman®) fueron comprados en Sigma Aldrich (St. Louis, MO). La cámara de Neubauer para recuento celular (Hirschmann®) fue adquirida en Heyn y Cía Ltda. Los reactivos para quimioluminiscencia (ECL) fueron comprados en PerkinElmer Life Sciences (Boston, MA) y los materiales de plástico estéril para los ensayos con cultivo celular fueron adquiridos en Corning Inc. (New York, NY). La leche descremada era de la marca comercial “Svelty”.

5.2. METODOLOGÍAS

5.2.1. MATERIAL VEGETAL

El material vegetal correspondió a las hojas de 10 genotipos de *U. molinae* provenientes del banco de germoplasma del Instituto Nacional de Investigaciones Agropecuarias (INIA), Carillanca, IX Región. Estas muestras fueron cultivadas bajo condiciones agronómicas y edafoclimáticas controladas y fueron recolectadas en el mes de mayo del año 2013. Una excepción correspondió al genotipo ZF-18, el cual se debió recolectar nuevamente en el mes de mayo del año 2015 debido a que de los extractos anteriores no quedaba una cantidad suficiente para realizar los ensayos propuestos en esta tesis. Estos 10 genotipos se seleccionaron previamente en nuestro laboratorio de acuerdo a los dos criterios que se presentan en la **Tabla 1**: i) mayor densidad de follaje y ii) mejor calidad de los frutos (criterios definidos por el INIA y publicados en Torres et al., 1999). Los testigos herbarios de cada genotipo se encuentran almacenados en el herbario de la Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas de la Universidad de Chile (SQF).

Tabla 1. Datos de procedencia y criterios de selección de los genotipos de *U. molinae*

Nº de accesión	Procedencia	Criterio de selección	Nº de Herbario
14-4	Purén, IX Región	Mayor follaje	SQF 22549
19-1	Porma, IX Región	Mayor follaje	SQF 22554
19-1 ^{ha}	Porma, IX Región	Mayor follaje	SQF 22543
8-2	Cauquenes, VII Región	Mayor follaje	SQF 22571
ZF-18	Putique, X Región	Mayor follaje	SQF 22550
19-2	Porma, IX Región	Calidad del fruto	SQF 22557
22-1	Mehuín, XV Región	Calidad del fruto	SQF 22552
23-2	Queule, XV Región	Calidad del fruto	SQF 22556
27-1	Aucar, X Región	Calidad del fruto	SQF 22555
31-1	Lenca, X Región	Calidad del fruto	SQF 22551

**Mayor follaje: mayor rendimiento (en términos de cantidad) de hojas calculados por el INIA.
Calidad del fruto: mejor calidad de fruto dentro de los cultivos evaluados bajo los criterios definidos por el INIA.**

5.2.2. EXTRACCIÓN SERIADA DE LAS HOJAS DE *U. MOLINAE* DE DISTINTOS GENOTIPOS

Los extractos que se utilizaron en los distintos ensayos de esta tesis correspondieron a los extractos etanólicos (EETs) y a los extractos de acetato de etilo (EAEs), los cuales fueron obtenidos por medio de una extracción seriada de las hojas secas y molidas de murtila con solventes de polaridad creciente: hexano (EH), diclorometano (EDCM), acetato de etilo (EAE) y etanol (EET). Las hojas se maceraron con cada solvente hasta agotar completamente el material vegetal (**Figura 5**), a continuación se eliminó gran parte del solvente mediante un evaporador rotatorio hasta obtener los extractos concentrados. Finalmente, dichos extractos fueron secados en una estufa con vacío a 30 °C , obteniendo los extractos secos que se utilizaron para el análisis químico y los ensayos celulares. Los detalles de la obtención de los extractos seriados y de los rendimientos de cada uno de ellos se encuentran en el trabajo de Peña-Cerda et al. (2017).

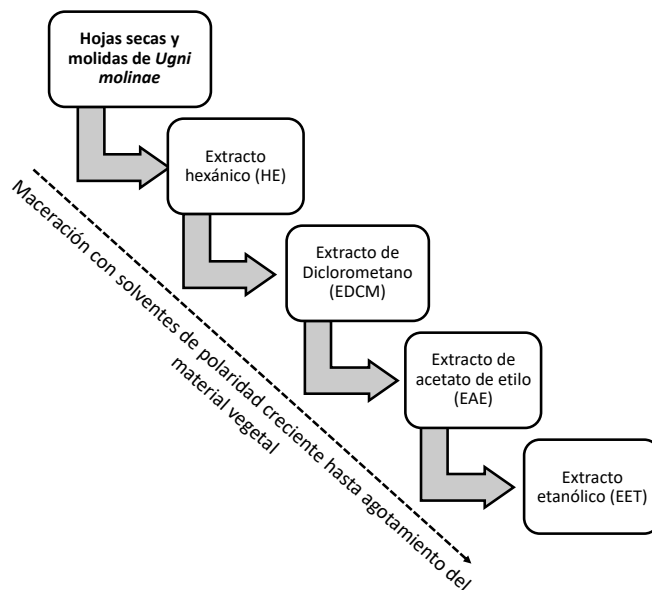


Figura 5. Proceso de extracción seriada de las hojas de *Ugni molinae* de los distintos genotipos seleccionados. EHE: extracto hexánico, EDM: extracto de diclorometano, EAE: extracto de acetato de etilo, EET: extracto etanólico.

5.2.3. SELECCIÓN DE LOS EETs Y EAEs DE DISTINTOS GENOTIPOS DE MURTILLA Y DIFERENCIADOS POR SU COMPOSICIÓN QUÍMICA

Con la finalidad de evaluar comparativamente el efecto de los EETs y EAEs de las hojas de murtila de distintos genotipos sobre la funcionalidad de fibroblastos dérmicos humanos y correlacionar los resultados con la composición química de las hojas, se propuso seleccionar extractos que se diferenciaron en su composición de polifenoles y de triterpenoides. De acuerdo a este criterio, por lo tanto, se seleccionaron dos EETs y dos EAEs: los primeros diferenciados por poseer la menor y la mayor cantidad de fenoles y de taninos totales, y los otros dos, diferenciados por su contenido de triterpenos pentacíclicos.

Cabe resaltar que el análisis de la composición química de los EETs y EAEs de los 10 genotipos de las hojas de murtila recoletadas en el año 2013 se había realizado previamente en nuestro laboratorio (Peña-Cerda et al., 2018; Arancibia-Radich et al., 2016), por lo que en esta tesis se debió completar la información analizando el contenido de taninos totales (CTT) que no se encontraba evaluado en estos extractos. El esquema de la **Figura 6** detalla el procedimiento de selección y los ensayos celulares realizados con los extractos.

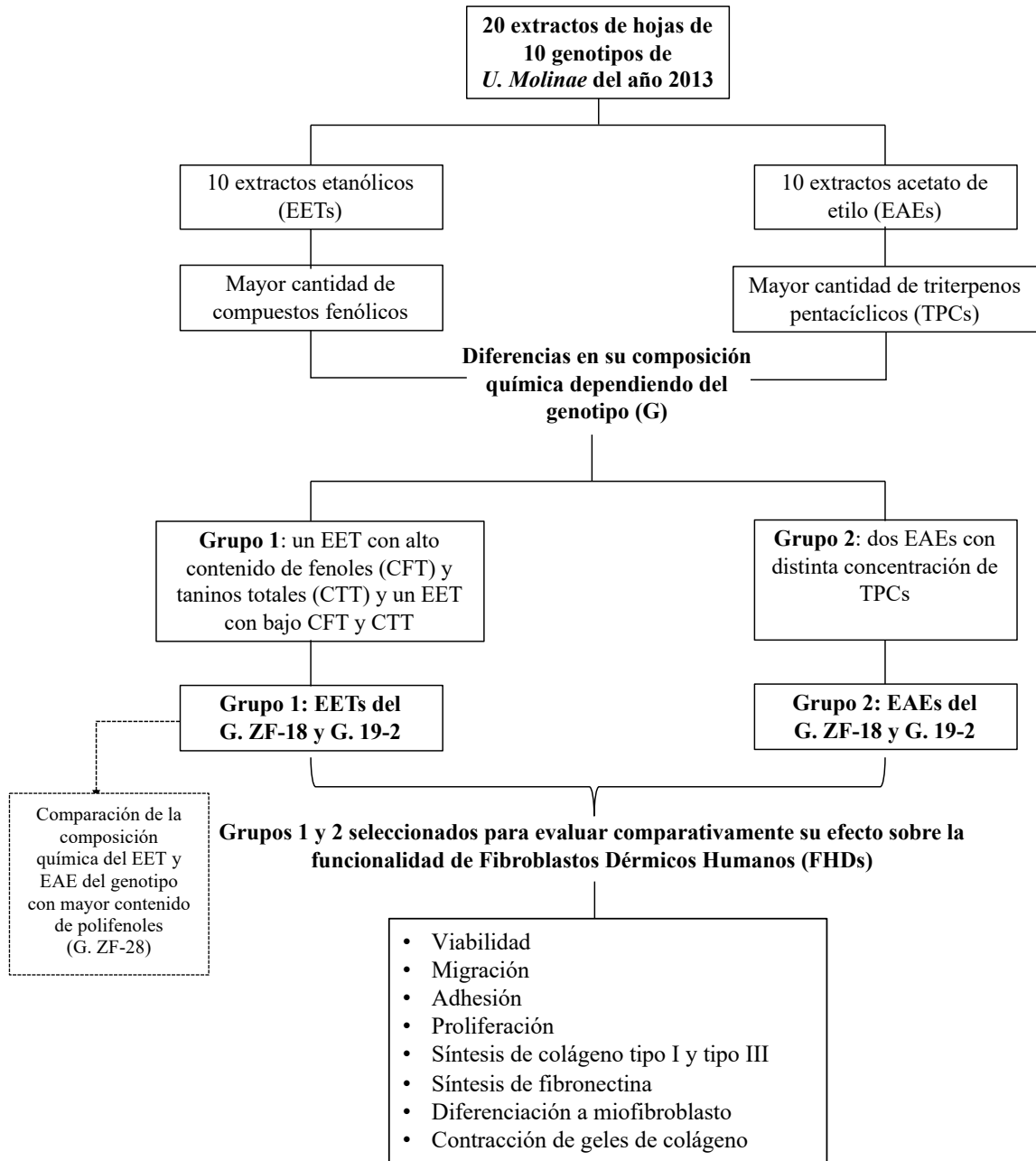


Figura 6. Esquema de selección de los EETs y EAEs de las hojas de murtila para los estudios celulares con fibroblastos dérmicos humanos

5.2.3.1. Determinación del contenido de fenoles totales (CFT) y del contenido de taninos totales (CTT) en los EETs y EAES de los 10 genotipos de murtila

Se utilizó la técnica espectrofotométrica de Folin-Ciocalteu (Cicco et al., 2009), en la cual los compuestos fenólicos reducen el reactivo de Folin-Ciocalteu (R-FC), pasando desde un color amarillo a un color azul. La cantidad de taninos presentes en los extractos de hojas de murtila se determinó en base a la metodología de Doll et al. (2012), que consiste en la precipitación de los taninos con gelatina, separándolos de los otros fenoles. La metodología se dividió en tres etapas:

5.2.3.1.1. Determinación del contenido de fenoles totales (CFT): 30 μ L de cada extracto (n=3) disuelto en etanol 80% v/v a concentraciones de 0,25-0,30 mg/mL se mezclaron con 30 μ L del R-FC al 10% v/v. Esta mezcla se incubó por 2 min, se agregaron 240 μ L de Na₂CO₃ 5% p/v y se incubó a 40°C durante 20 min. Finalmente, se midió la absorbancia de la solución coloreada en un espectrofotómetro Multiskan GO a 700 nm. Los valores de cada medición se interpolaron en una curva de calibración utilizando ácido gálico como patrón a concentraciones entre 2 μ L - 10 μ L ($y = 0,0753x - 0,0053$; $p > 0,05$) y los resultados se expresaron en mg equivalentes de ácido gálico/g extracto seco (mg EAG/g ES). En el caso del contenido de taninos totales, los valores de absorbancia se interpolaron en una curva de ácido tánico a concentraciones entre 3 μ L - 9 μ L ($y = 0,0784x - 0,0033$; $p > 0,05$) y se expresaron en mg equivalentes de ácido tánico/g extracto seco (mg EAT/g ES). El protocolo de la determinación del CFT se detalla en la **Tabla 2**.

5.2.3.1.2. Separación de los taninos de los otros compuestos fenólicos: Un volumen de 10 mL de los extractos disueltos en etanol 80% v/v se mezcló con 1 g de caolín, 5 mL gelatina al 20% (p/v) y 10 mL de una solución de NaCl saturada. La mezcla resultante se centrifugó durante 30 min, se descartó el precipitado y el centrifugado se sometió a diluciones sucesivas con etanol para eliminar el exceso de gelatina. La solución se filtró y se obtuvo el sobrenadante conteniendo los fenoles residuales del extracto (FR).

Los FR de cada extracto se cuantificaron mediante la técnica de Folin-Ciocalteu, tal como se indicó en el punto 4.2.3.1.1.

5.2.3.1.3. Cuantificación de taninos: El contenido total de taninos (CTT) de los extractos de cada genotipo se calculó indirectamente mediante la diferencia de FT-FR (n=3).

Tabla 2. Protocolo de la cuantificación de fenoles totales mediante el ensayo de Folin-Ciocalteu

Reactivos	Muestra a analizar	Blanco
EET en EtOH 80% (v/v)	30 µL	-
EtOH 80% (v/v)	-	30 µL
RF-C 10%	30 µL	30 µL
	Incubar 2 min a 40 °C	Incubar 2 min a 40 °C
Na₂CO₃ 5% (p/v)	240 µL	240 µL
Volumen final	300 µL	300 µL
	Incubar 20 min a 40 °C	Incubar 20 min a 40 °C
	Leer a $\lambda = 765$ nm	Leer a $\lambda = 765$ nm

5.2.3.2. Contenido de triterpenos pentacíclicos (TPCs) de los EAEs de los 10 genotipos de murtila

La cuantificación de los compuestos triterpenoides de los EAEs de las hojas de murtila recolectadas en el año 2013 se encuentra detallada en el trabajo de Arancibia-Radich et al. (2016), la cual se determinó mediante la técnica de CLAE-DAD. Esta información fue la que se utilizó para seleccionar los extractos del grupo 2, diferenciados por su composición de TPCs.

5.2.4. CARACTERIZACIÓN QUÍMICA COMPARATIVA DEL EET Y EAE DE LAS HOJAS DEL GENOTIPO CON MAYOR CONTENIDO DE POLIFENOLES: G. ZF-18

De acuerdo a los resultados del análisis comparativo del contenido de fenoles y taninos totales de los EETs y EAES de 10 genotipos de murtilla, se seleccionó el G. ZF-18 debido a que presentó la mayor concentración de estos compuestos. Con el objetivo de obtener una mayor cantidad de extractos de las hojas de este genotipo y, además, para llevar a cabo un análisis comparativo más exhaustivo de su composición química, se elaboraron nuevos extractos seriados con hojas del G. ZF-18 recolectadas en el año 2015. La caracterización química de estos nuevos extractos se realizó mediante el análisis de espectros de masas en la plataforma GNPS (*Global Natural Products Social Molecular Networking*).

El nuevo material vegetal correspondió a las hojas del G. ZF-18 de *U. molinae* provenientes del Instituto Nacional de Investigaciones Agropecuarias (INIA), Carillanca, IX Región, el cual fue cultivado bajo condiciones agronómicas y edafoclimáticas controladas, al igual que el resto de los genotipos analizados. Las muestras fueron recolectadas en el mes de mayo del año 2015 y el testigo herbario de este genotipo (SQF 22550) se encuentra almacenado en el herbario de la Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas de la Universidad de Chile (SQF). El método de obtención del EET y EAE fue el mismo que se realizó para el material vegetal anterior, detallado en el punto **6.2.2**.

Por otro lado, con el objetivo de comparar los resultados del análisis químico de los extractos de las hojas del G. ZF-18 del año 2015 (G. ZF-18₂₀₁₅) con los resultados de los extractos del año 2013 (G. ZF-18₂₀₁₃), se realizaron los siguientes ensayos:

5.2.4.1. Determinación del contenido de fenoles totales (CFT) y del contenido de taninos totales (CTT)

Debido a que el objetivo del análisis químico fue comparar con los valores obtenidos por el EET y EAE del G. ZF-18₂₀₁₃, se utilizó la misma metodología descrita en el punto 6.2.3.1 para determinar el CFT y el CTT del EET y EAE del G. ZF-18₂₀₁₅.

5.2.4.2. Determinación del contenido total de flavonas y flavonoles (CFF)

El método colorimétrico con AlCl₃ se fundamenta en que este reactivo forma complejos estables con el grupo ceto del C-4 y los hidroxilos del C-3 de flavonoles y C-5 de flavonas (Figura 7). Además, el AlCl₃ forma complejos ácidos lábiles con los grupos ortodihidroxis 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-dihidroxis adicionales, como rutina, quercetina y miricetina, tienen un máximo de absorbancia a 415-430 nm (Chang et al., 1997).

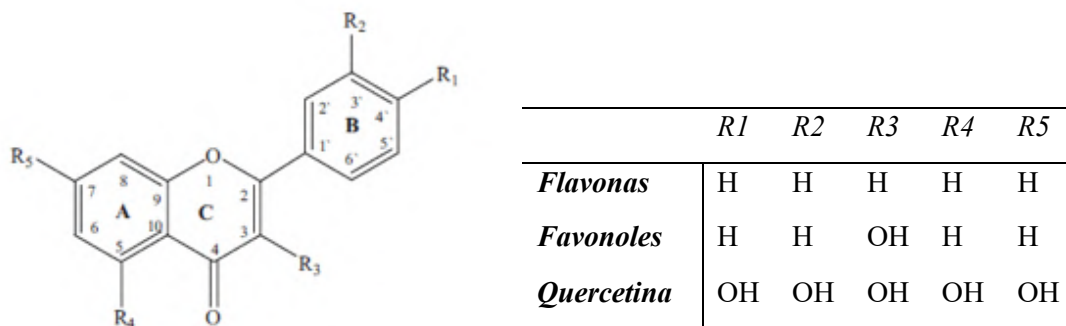


Figura 7. Esqueleto molecular de flavonas y flavonoles

El método utilizado para la medición de flavonas y flavonoles en los extractos de murtila se basó en el descrito por Chang et al. (1997), con algunas modificaciones que se describen en el protocolo de la **Tabla 3**. El EET y el EAE se disolvieron en MeOH a concentraciones finales de 0,2 y 0,1 mg/mL respectivamente. Se agregaron 30 µL de la solución metanólica

del extracto, 10 μL de AlCl_3 10% (v/v), 10 μL de CH_3COONa 1M y 250 μL de agua destilada. Se agitó para homogeneizar y se incubó a 25°C durante 30 min. Finalmente, se leyó la absorbancia del producto de coloración amarilla a una longitud de onda de 415 nm. Las absorbancias se interpolaron en una curva de calibración realizada con quercetina a concentraciones entre 4-14 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ($y = 0,0489x - 0,0077$) y los resultados se expresaron en mg equivalentes de quercetina por g de extracto seco (mg EQ/g ES).

Tabla 3. Protocolo de la cuantificación de flavonoides mediante el ensayo colorimétrico con AlCl_3

Reactivos	Muestra a analizar	Blanco
EET en MeOH	30 μL	-
MeOH	-	30 μL
AlCl_3 10% (v/v)	10 μL	10 μL
CH_3COONa 1M	10 μL	10 μL
Agua destilada	250 μL	250 μL
Volumen final	300 μL	300 μL
	Incubar 30 min a 25°C	Incubar 20 min a 25°C
	Leer a $\lambda = 415$ nm	Leer a $\lambda = 415$ nm

5.2.4.3. Cuantificación de triterpenos pentacíclicos (TPCs) mediante CLAE-DAD

Se cuantificaron los ácidos madecásico, asiático, corosólico, maslínico y la mezcla de los ácidos oleanólico y ursólico con el fin de estandarizar el EET y el EAE del G. ZF-18₂₀₁₅ y comparar los resultados con obtenidos previamente en el laboratorio con los extractos del G. ZF-18₂₀₁₃. Las condiciones cromatográficas fueron las utilizadas previamente en nuestro laboratorio para cuantificar TPCs en hojas de distintos genotipos de murtila (Arancibia-Radich et al., 2016), los cuales también han sido identificados mediante RMN y CLAE-EM (Aguirre et al., 2006; Goity et al., 2013). Para la identificación de los TPCs presentes en los extractos, se realizó una comparación de los tiempos de retención (t_r) de los picos de los cromatogramas respectivos con los t_r de los patrones y por comparación

con los cromatogramas que se realizaron bajo condiciones similares en la publicación de Arancibia-Radich et al. (2016).

Las muestras se analizaron en triplicado en un equipo de CLAE UltiMate 3000, inyectando 20 μ L de soluciones metanólicas de los extractos a 10.000 ppm en una columna Symmetry C18 de dimensiones 250 \times 4.6 mm de diámetro interno y 5 μ m de tamaño de partícula (Waters Corp., MA-USA). Como fase móvil se utilizó acetonitrilo:ácido fórmico 0,1% en una proporción de 60:40, un flujo de 0,6 mL/min y a 201 nm de longitud de onda para los ácidos madecásico y asiático, y acetonitrilo:ácido fórmico 0,1% en una proporción de 75:25 para los ácidos triterpénicos de menor polaridad. Los resultados se obtuvieron mediante la interpolación de las áreas bajo la curva de cada pico en una curva de calibración construida con ácido asiático, ácido ursólico y ácido oleanólico (ANEXO 1). Los resultados se expresaron como g equivalentes del compuesto de referencia por 100 g de extracto seco.

5.2.4.4. Determinación del perfil fenólico mediante CLAE-UV-EMⁿ

La determinación de la composición fenólica del EET y EAE del G. ZF-18₂₀₁₅ fue realizada mediante cromatografía líquida de alta eficiencia (CLAE) acoplada a un espectrómetro de masa seguida de la semi-cuantificación de los compuestos identificados. El equipo utilizado fue un sistema CLAE Agilent 1100 acoplado a un espectrómetro de masas de tipo electrospray-trampa iónica Esquire 4000 ESI-IT. Se utilizaron los softwares Agilent ChemStation for LC 3D y EsquireControl 5.2 para el manejo del sistema CLAE y el espectrómetro de masas, respectivamente.

Para el proceso de separación de los compuestos presentes en los EET y EAE se utilizó una columna Symmetry C18 de dimensiones 250 \times 4.6 mm de diámetro interno y 5 μ m de tamaño de partícula (Waters Corp., MA-USA), donde se inyectaron los extractos a una concentración de 10.000 ppm. El proceso se llevó a cabo a T° ambiente utilizando un sistema de gradiente de una mezcla acetonitrilo, agua y ácido fórmico 0,1% tal como se

detalla en la **Tabla 4**. El perfil fenólico del EET y EAE mediante el sistema CLAE se realizó a longitudes de onda de detección de 280 y 360 nm con el objetivo fue determinar las mejores condiciones para la separación de los picos cromatográficos y facilitar la posterior identificación de los compuestos fenólicos en el espectrómetro de masas.

El proceso de ionización (nebulización) por electrospray (ESI) se realizó a 3000 V asistido por nitrógeno como gas nebulizador a una T° de 365° C, una presión de 50 psi y un flujo de 10 L/min. Los espectros de masa se adquirieron en modo positivo y negativo y fueron analizados utilizando el software gratuito Mass++.

Tabla 4. Sistema de gradiente utilizado para la separación de compuestos fenólicos mediante CLAE-DAD

Tiempo (min)	Gradiente	
	Fase móvil A	Fase móvil B
0	90	10
8	84	16
45	75	25
55	65	35
72	20	80
75	0	100
80	95	5
90	90	10

Fase móvil A: H₂O - ácido fórmico 0,1% (98 - 2)

Fase móvil B: acetonitrilo - ácido fórmico 0,1% - H₂O (18 - 80 - 2)

5.2.4.5. Derreplicación de alto rendimiento (*High-Throughput Dereplication*) y redes moleculares (*molecular networking*) para la identificación de compuestos fenólicos

Para la identificación de los compuestos presentes en el EET y EAE de hojas del G. ZF-18₂₀₁₅ se utilizó la plataforma de libre acceso Global Natural Products Social Molecular Networking (GNPS). Esta plataforma permite el almacenamiento, el análisis y la difusión

del conocimiento de espectros de EM/EM y proporciona la capacidad de analizar un conjunto de datos y compararlo con todos los datos disponibles en librerías públicas.

Una de las principales limitaciones para descubrir nuevas entidades químicas es determinar qué metabolitos son compuestos conocidos dentro de muestras biológicas complejas, por lo que una forma de superar esta limitación es realizar una derreplicación comparando los espectros EM² del metabolito desconocido con una biblioteca de espectros EM/EM generados a partir de metabolitos caracterizados estructuralmente mediante distintos espectrómetros de masas, incluyendo Ion Trap (trampa de iones), qTOF (tiempo de vuelo con cuadrupolo), and FT-ICR (resonancia de ciclotrón iónica por transformada de Fourier). Esta comparación se basa en la puntuación de coseno (*cosine score*) de similitud de los espectros EM/EM, siendo mayor la similitud entre los espectros comparados cuando el cosine score se acerca más a 1. Entre la colección disponible en la plataforma GNPS se encuentran librerías importantes para productos naturales, como MassBank, ReSpec, y NIST22, además de una librería propia de GNPS.

Por otro lado, las redes moleculares son visualizaciones del espacio químico presente en experimentos de espectrometría de masas en tándem (EM/EM), permitiendo detectar conjuntos de espectros de moléculas relacionadas (redes moleculares), incluso cuando los espectros mismos no coinciden con ningún compuesto conocido. La visualización de redes moleculares en GNPS representa cada espectro como un nodo, y las alineaciones de espectro a espectro como bordes (conexiones) entre nodos, generando un mapa de red molecular global (**Figura 8**) que facilita la comparación química entre distintos grupos, en este caso, la comparación entre los EET y EAE del G. ZF-18₂₀₁₅. Para la obtención y diseño de las figuras de las redes moleculares se utilizó el programa Cytoscape® y las estructuras y nombres de los compuestos identificados se confirmaron en Pubchem. En el **ANEXO 2** se presenta una tabla con las definiciones más importantes asociadas a derreplicación y creación de redes moleculares en la plataforma GNPS.



Figura 8. Redes moleculares (*molecular networking*). Estas redes se construyen a partir de la alineación de los espectros EM/EM entre sí. Los bordes (*edges*) que conectan los nodos (espectros EM) se definen mediante un esquema de puntuación de coseno (*cosine score*) que determina la similitud de dos espectros EM/EM con puntajes que van desde 0 (totalmente diferente) a 1 (completamente idéntico). *Fuente: Wang et al. (2016).*

De acuerdo a lo anterior, la metodología utilizada para el análisis fue la siguiente:

1. Se creó una red molecular utilizando el flujo de trabajo en línea (<https://ccms-ucsd.github.io/GNPSDocumentation/>) en el sitio web de GNPS (<http://gnps.ucsd.edu>). Los datos se subieron a la plataforma en formato mzML.
2. Los datos se filtraron eliminando todos los iones de fragmentos EM² con diferencias de +/- 17 Da del precursor m/z.
3. La tolerancia de masa de iones precursores se ajustó a 2,0 Da (*Mass Difference*) y una tolerancia de iones de fragmentos EM² de 0,5 Da.
4. Luego se creó una red donde los bordes se filtraron para tener una puntuación de coseno superior (*cosine score*) a 0,7 y más de 6 picos coincidentes (*peaks shared*).

Además, los bordes entre dos nodos se mantuvieron en la red si y solo si cada uno de los nodos apareciera en los 10 nodos de mayor similitud respectivos.

5. Finalmente, el tamaño máximo de una familia molecular se estableció en 100, y los bordes de puntuación más bajos se eliminaron de las familias moleculares.
6. Los espectros se buscaron en las bibliotecas espectrales de GNPS y se filtraron de la misma manera que los datos de entrada. Se requirió que todas las coincidencias mantenidas entre los espectros de red y los espectros de la biblioteca tuvieran una puntuación superior a 0,7 y al menos 6 picos coincidentes.

5.2.5. EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE *IN VITRO* DEL EET y EAE del G. ZF-18₂₀₁₅

Se realizó un estudio comparativo de la actividad antioxidante *in vitro* de ambos extractos mediante dos metodologías basadas en reacciones óxido-reducción, donde en una se evaluó la capacidad reductora de los extractos (FRAP) y en la otra la capacidad de neutralizar el radical DPPH. A pesar de que este tipo de metodologías no se correlacionan necesariamente con un efecto antioxidante *in vivo* de los extractos, sus ventajas radican en que son métodos rápidos, reproducibles y requieren pequeñas cantidades de los compuestos químicos que se analizan (Santos-Sánchez et al., 2018), por otro lado, los resultados se compararon con los resultados obtenidos anteriormente para los extractos del G. ZF-18 de hojas recolectadas en el año 2013. En la **Tabla 5** se presentan las principales características y mecanismos de acción de las metodologías utilizadas.

Tabla 5. Características de las metodologías para determinar la actividad antioxidante mediante los métodos FRAP y apagamiento del radical DPPH

Método	Mecanismo de acción	Características
Ferric-reducing antioxidant Power (FRAP)	SET	Método colorimétrico que evalúa la reducción del complejo Fe^{3+} -tripiridiltriazina (Fe^{3+} -TPTZ), convirtiéndolo en la forma ferrosa (Fe^{2+} -TPTZ)
Inhibición del radical 2,2-difenil-1-picrilhidrazil (DPPH•)	SET o HAT	Método colorimétrico basado en la medición de la capacidad que tienen los antioxidantes de neutralizar el radical DPPH•

SET: Reacciones de transferencia de un electrón

HAT: Reacciones de transferencia de un átomo de hidrógeno

5.2.5.1. Ferric reducing antioxidant power (FRAP)

La reacción mide la reducción del complejo férrico-2,4,6,tripiridil-s-triazina (TPTZ), en la cual el hierro férrico (Fe^{3+} -TPTZ) se reduce a ion ferroso a bajo pH, causando la formación de un complejo ferroso-tripiridiltriazina coloreado (Fe^{2+} -TPTZ), que absorbe a una longitud de onda de 593 nm (Benzie y Strain, 1996).

El reactivo FRAP fue preparado mezclando 1020 μL de solución tampón pH 3,6, 100 μL de TPTZ 10 mM y 100 μL de $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 20 mM. El EET y el EAE se disolvieron en MeOH a concentraciones finales de 8,0 y 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ respectivamente y el procedimiento se realizó de acuerdo con la **Tabla 6**. Los valores fueron analizados a los 4, 30 y 60 min debido a la posible subestimación del valor FRAP al realizar el ensayo en tiempos cortos (Henriquez et al., 2010), como a los 4 min propuestos inicialmente por Benzie y Strain en 1996. Previamente se realizó una curva de calibración, utilizando como patrón $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (soluciones metanólicas entre 10 – 40 $\mu\text{mol}/\text{L}$), bajo las mismas condiciones

descritas en la **Tabla 6**. En esta curva se interpolaron las absorbancias obtenidas por extractos de las hojas de murtila, obteniendo el valor FRAP para los distintos tiempos expresado en mmol Fe²⁺/g ES.

Tabla 6. Protocolo para el ensayo antioxidante FRAP

Reactivos	Muestra a analizar	Blanco
EET o EAE 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

5.2.5.2. Apagamiento del radical 2,2-difenil-1-picrilhidrazilo (DPPH)

El radical 1,1-difenil-2-picrilhidrazilo (DPPH•) se caracteriza por ser un radical libre estable porque los electrones pi de los sistemas aromáticos presentes en la molécula pueden compensar la falta de un electrón. La deslocalización del electrón da lugar a un color violeta intenso, caracterizado por una máxima absorbancia en solución a 517 nm aproximadamente. Por lo tanto, el ensayo se basa en la neutralización del radical DPPH• por acción de un antioxidante, generando una disminución en la absorbancia a 517 nm, proceso que es inversamente proporcional a la concentración y actividad de la muestra antioxidante (Santos-Sánchez et al., 2018).

El ensayo se realizó de acuerdo la metodología de Peña-Cerda et al. (2017). Con el espectrofotómetro de multiplacas Multiskan™ GO (Thermo Scientific™) a 20 °C, se mezclaron 25 µL de EAE/EET disueltos en MeOH a diferentes concentraciones (10 - 40 ppm para los EAE y 2 - 16 ppm para los EET) con 235 µL de una solución metanólica del radical DPPH a 40 µg/mL e inmediatamente se colocó la tapa de plástico de las microplacas de 96 pocillos de para evitar la rápida evaporación de la solución. Las lecturas

de absorbancia se realizaron a 517 nm en intervalos de 10 s hasta completar los 90 min de reacción (**Tabla 7**). Con los valores de absorbancia a 0 min (Ao) y a 90 min (Af) se determinó el %DPPH remanente de acuerdo a la fórmula:

$$\%DPPHrem = (Af/Ao) \times 100$$

El % DPPHrem fue obtenido para cada concentración evaluada tanto de los EAE como de los EET, elaborándose las curvas % DPPHrem vs EAE/EET (µg/mL). La concentración de extracto a la cual se produce una disminución del 50% en la absorbancia del radical DPPH, se le llamó concentración efectiva 50 (CE₅₀).

Tabla 7. Protocolo para evaluar la actividad antioxidante mediante el apagamiento del radical DPPH

Reactivos	Muestra a analizar	Blanco
EET o EAE en MeOH	25 µL	-
MeOH	-	25 µL
DPPH en MeOH	235 µL	235 µL
Volumen final	260 µL	260µL
	Bucle cinético: 540 lecturas durante 90 min a 20°C Leer a λ = 517 nm	Bucle cinético: 540 lecturas durante 1 hora a 20°C Leer a λ = 517 nm

5.2.6. EVALUACIÓN DEL EFECTO *IN VITRO* DE LOS EETs y EAEs SELECCIONADOS SOBRE LA FUNCIONALIDAD DE FIBROBLASTOS DÉRMICOS HUMANOS

5.2.6.1. Pruebas de solubilidad de los EAEs y EETs

Con el fin de determinar las concentraciones de los EETs y EAEs seleccionados que se pudieran disolver en medio acuoso y DMSO 1% v/v sin generar precipitado (vehículo para los ensayos celulares), se realizó una prueba de solubilidad con distintas concentraciones de cada extracto seleccionado (1-300 µg/mL). Se realizó un barrido de

absorbancias entre 200 y 520 nm en un espectrofotómetro de microplacas y se determinó visualmente y de acuerdo al espectro obtenido, las concentraciones en las que los extractos se encontraban completamente disueltos en medio acuoso. En las concentraciones de extracto insolubles, se observó una pérdida de la linealidad a la longitud de onda máxima, lo cual se relacionó a la formación de precipitado.

5.2.6.2. Aislamiento de fibroblastos dérmicos humanos (FDHs) a partir de cultivo primario

Los FDHs utilizados para evaluar el efecto de los extractos de murtila sobre la funcionalidad de éstas células fueron obtenidos desde muestras de piel remanente de cirugías estéticas de acuerdo a dos metodologías: explante y digestión enzimática. En el **ANEXO 3** se encuentra la resolución de la aprobación del proyecto por parte del Comité de Ética del Hospital Clínico de la Universidad de Chile, cuyo número es N° OAIC 1062/19 y mediante el cual se permitió el uso de piel humana para la obtención de células.

a. Obtención de FDHs mediante explante de piel

Las muestras de piel se transportaron al laboratorio en DMEM/F-12 frío y se trabajaron inmediatamente luego de la entrega post-cirugía. Para ello, una parte de la muestra (1/4 del área) fue utilizada para explante y el resto para digestión enzimática (Rittié y Fisher, 2005). El trozo de piel para explante se limpió con PBS 1X, se eliminó el tejido adiposo y se cortó en pequeños trozos, de 1 mm² aproximadamente, con tijeras y pinzas estériles. Cada trozo se colocó cuidadosamente sobre los vértices de una red de líneas horizontales y verticales realizadas con una aguja de jeringa en una placa de cultivo (p100), tal como se muestra en la **Figura 9**. Una vez que se insertaron los trozos de piel (con la dermis en contacto con el plástico de la placa de cultivo), éstos se dejaron secar durante 1 min aproximadamente y a continuación cuidadosamente se agregaron 10 mL de medio de cultivo (DMEM/F-12 + SFB 10%). Posteriormente, las placas de cultivo se incubaron a

37°C y CO₂ (5%) y se esperó el tiempo necesario para que los fibroblastos migraran desde los explantes de piel, se adhirieran al plástico y proliferaran (un mes aproximadamente para llegar a un 90% de confluencia).

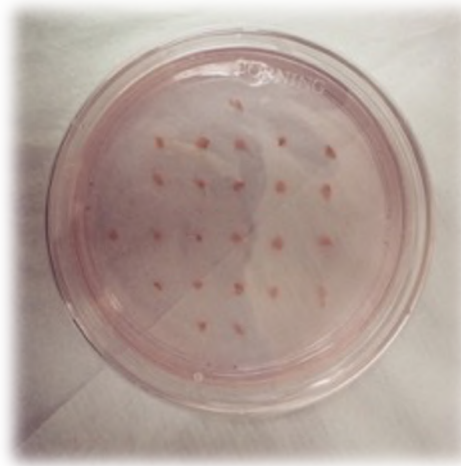


Figura 9. Placa de cultivo con explantes de piel humana

b. Obtención de FDHs mediante digestión enzimática

La muestra de piel restante (3/4 del área) se sometió a un proceso de digestión enzimática con colagenasa tipo II. Para ello, la piel se limpió, se eliminó el tejido adiposo y se trituró con pinzas y tijeras estériles. Luego, la piel triturada se agregó a una botella de cultivo de 75 mm² junto a 50 mL de solución de enzima y se dejó agitando durante 2 h en un agitador-incubador a 37°C. Transcurrido este tiempo, se descartaron los trozos de tejidos más grandes y el tejido digerido se vertió en placas de 100 mm², a las cuales se les agregó 5 mL de DMEM/F-12 + suero fetal bovino 10% (SFB 10%), se incubaron a 37°C y 5% CO₂. Las placas fueron observadas diariamente al microscopio óptico con aumento 10X para determinar si los fibroblastos se encontraban adheridos en el fondo y así proceder al cambio del medio de cultivo (antes de esto no se debe eliminar el medio de cultivo con tejido digerido, ya que se eliminarán las células que se encuentran suspendidas en él).

Luego de esto, se esperó que las células llegaran a confluencia, renovando el medio de cultivo (DMEM/F-12 + SFB 10%) cada 48 h.

5.2.6.3. Pasajes celulares y criopreservación de los FDHs

5.2.6.3.1. Amplificación y congelamiento

Una vez que se alcanzaba un 90-100% de confluencia mediante ambas metodologías de obtención de fibroblastos, las células se amplificaron con el fin de utilizarlas en pasajes 4-6 para los ensayos *in vitro* con los extractos, mientras que los pasajes anteriores se criopreservaron en nitrógeno líquido. Para ello, las células se trataron con tripsina 1X durante 8-10 min, se recolectaron en tubos de 15 mL, se centrifugaron a 1500 rpm por 5 min y se resuspendieron en 1 mL de DMEM/F-12 + SFB 10% y DMSO 10%. Las células resuspendidas (1×10^6 células/mL) se traspasaron a criotubos de 2 mL y se congelaron en una caja de plumavit a -80 °C durante 24 h. Transcurrido este tiempo, los criotubos se dejaron congelados en un tanque de nitrógeno líquido a -127 °C y se descongelaban a medida de que fuera necesario utilizarlos.

5.2.6.3.2. Descongelamiento

Los criotubos se retiraron del estanque de nitrógeno líquido y se descongelaron rápidamente en un baño termorregulado a 37 ° C. Luego, el contenido se traspasó a una o dos botellas de cultivo de 75 mm², se agregaron 8 mL de DMEM/F-12 + SFB 10% y se incubó a 37 °C y 5% CO₂. Finalmente, cuando las células se encontraban confluentes, se procedía a realizar el proceso de amplificación descrito anteriormente.

5.2.6.4. Viabilidad celular

Se evaluó la viabilidad celular de los FDHs frente a distintas concentraciones de los extractos de murtilla, utilizando dos metodologías diferentes. Para ambos ensayos de viabilidad, se evaluaron concentraciones entre 0,1-100 µg/mL para los EETs y entre 0,1-80 µg/mL para los EAEs, los cuales se agregaron al medio de cultivo (DMEM/F-12) disueltos en DMSO a una concentración final de 1% v/v. Se utilizó DMEM/F-12 + DMSO 1% como control negativo (vehículo). Ambos ensayos se realizaron con un n=3. Además, con los datos obtenidos en cada uno de los ensayos se calculó la concentración letal 50 (CL₅₀) de cada extracto.

a. Recuento celular mediante exclusión con azul de tripán

Este ensayo se utiliza para determinar el número de células viables presentes en una suspensión de células y se basa en el principio de que las células vivas poseen membranas celulares intactas que impiden la entrada de ciertos colorantes, mientras que las células muertas pierden esa capacidad (Strober, 2001). Las células incubaron con tripsina 1X durante 8-10 min, se recolectaron y se contaron en una cámara de Neubauer. Se sembraron 150.000 células en placas de cultivo de 35 mm, se privaron de suero durante 24 h y se agregaron diferentes concentraciones de cada extracto. Después de 24 h, las células tratadas se soltaron con tripsina 1X y el conteo celular se llevó a cabo en una cámara de *Neubauer*, agregando 20 µL de azul de tripán a 20 µL de la suspensión con células. El protocolo se resume en la **Figura 10** y el porcentaje de células viables se calculó de acuerdo a la fórmula:

$$\text{células viables (\%)} = \frac{\text{n}^\circ \text{ total de células viables por mL de alícuota}}{\text{n}^\circ \text{ total de células por mL de alícuota del control negativo}} \times 100$$

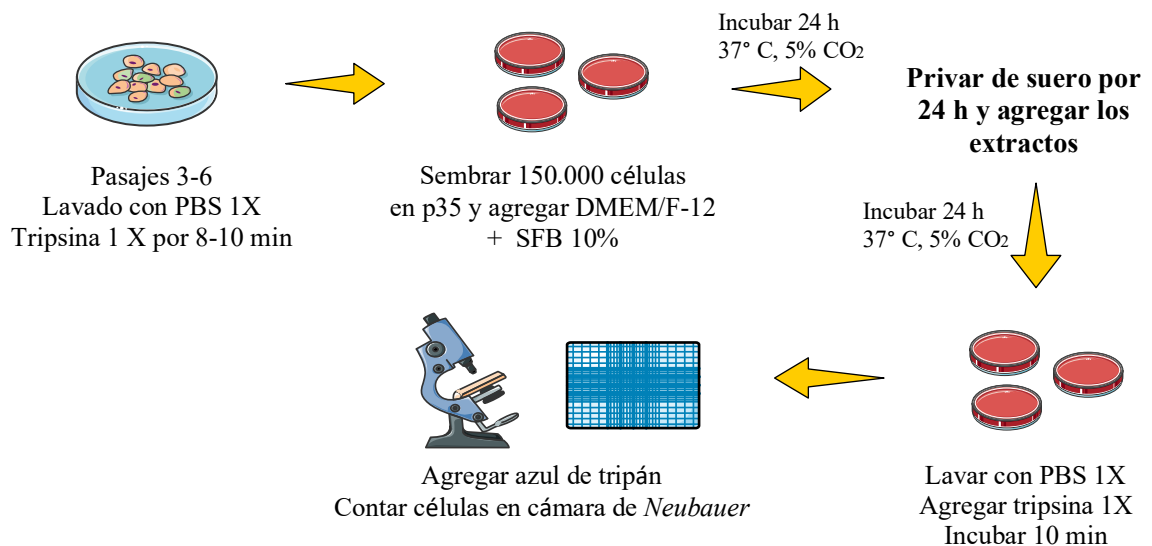


Figura 10. Protocolo para la determinación de viabilidad celular mediante exclusión con azul de tripán

b. Viabilidad celular determinada mediante el reactivo de alamarBlue™

Se realizó un segundo ensayo de viabilidad celular con el objetivo de complementar los resultados obtenidos mediante recuento celular con azul de tripán. El ensayo se basa en la capacidad de las células metabólicamente activas de convertir el reactivo resazurina en un indicador fluorescente y colorimétrico. Este compuesto es reducido por las células vivas a resofurina, cuya cantidad es proporcional al número de células viables y puede cuantificarse mediante fluorimetría (excitación entre 530 y 560 nm y emisión a 590 nm) o por espectrofotometría (mediciones de absorbancia a 570 nm y 600 nm) (Rampersad, 2012). Las células se soltaron con tripsina 1X durante 8-10 min, se recolectaron y se contaron en una cámara de *Neubauer* para sembrar 50.000 células en una placa de 24 pocillos en SFB 10% por 24 horas. Después de este tiempo, las células se privaron de suero por 24 h, se agregaron los extractos a las concentraciones mencionadas anteriormente y se incubó durante 24 h a 37°C y 5% CO₂. El protocolo se resume en la

Figura 11 y los resultados se obtuvieron a través mediciones de fluorescencia de cada grupo tratado y del control negativo según la fórmula:

$$\text{Células viables 24 h (\%)} = \frac{\text{Fluorescencia de células tratada}}{\text{Fluorescencia control negativo}} \times 100$$

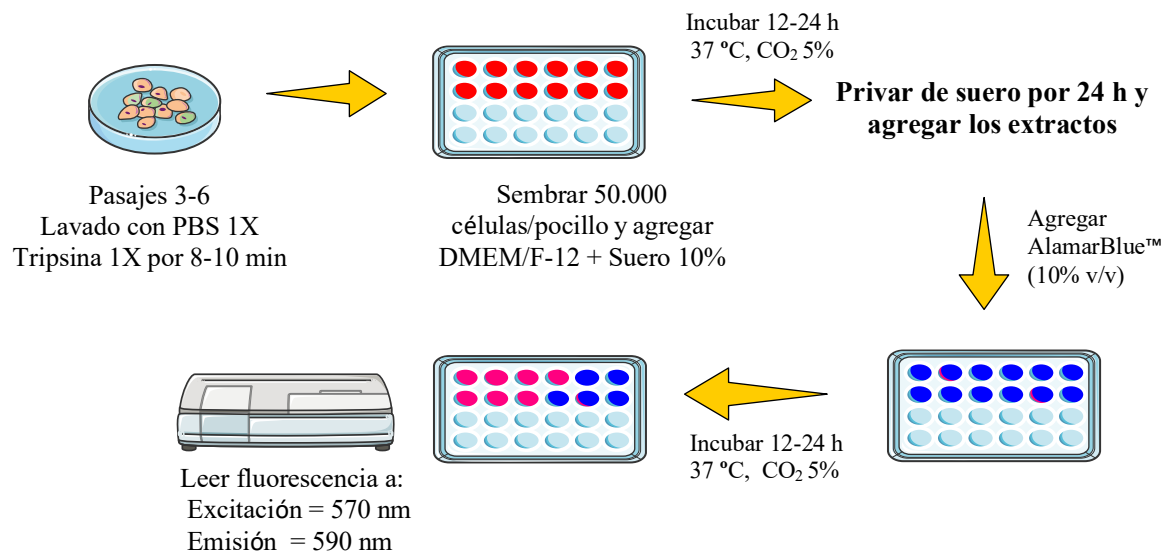


Figura 11. Protocolo para la determinación de la viabilidad celular de los FDHs con el reactivo de AlamarBlue™

c. Concentración letal 50 (CL₅₀)

Con el objetivo de determinar el efecto citotóxico de los extractos de murtila sobre los FDHs y comparar los resultados obtenidos por ambas metodologías de viabilidad celular, se realizó el cálculo de la CL₅₀. Este valor representa la concentración en la cual los extractos causan la muerte del 50% de las células y se calculó mediante el análisis de una curva sigmoidea de concentración-respuesta en el programa GraphPad Prism 6.0.

5.2.6.5. Migración celular determinada mediante el ensayo de la herida *in vitro* (*scratch assay*)

La metodología de migración *in vitro* para los FDHs se implementó de acuerdo a la metodología de Fronza et al. (2009) utilizando SFB 10% como control positivo y BrdU 0,1 mM como inhibidor de proliferación. Este último reactivo se agregó tanto al control positivo como a las células tratadas con extractos para evitar ambigüedad en el resultado, es decir, para que el cierre de la herida *in vitro* se produzca por migración de las células y no por un aumento en la proliferación.

De acuerdo al protocolo de la **Figura 12**, se sembraron 200.000 células/pocillo en placas de cultivo de 35 mm y se esperó un 100% de confluencia. Una vez confluentes, las células se privaron de suero y 24 h después se realizó el ensayo de migración por el método de la herida, la cual se realizó con la punta estéril de una pipeta (p200). Se lavó la placa con PBS 1X con el fin de eliminar las células remanentes y se agregaron los estímulos correspondientes para cada grupo control: (1) DMEM/F-12, (2) SFB 10%, (3) SFB 10% + BrdU 0,1 mM y (4) EET o EAE + BrdU 0,1 mM en ausencia de suero. Posteriormente, las células se incubaron a 37 °C y CO₂ 5% durante 24 h, tiempo después del cual se realizó la fijación y tinción de las células con cristal violeta al 0,3 % v/v en etanol 20%. Finalmente, se cuantificó el cierre de la herida mediante fotografías tomadas en un microscopio óptico con aumento 4X y el resultado se expresó como % de extensión de la herida utilizando el programa Image J.

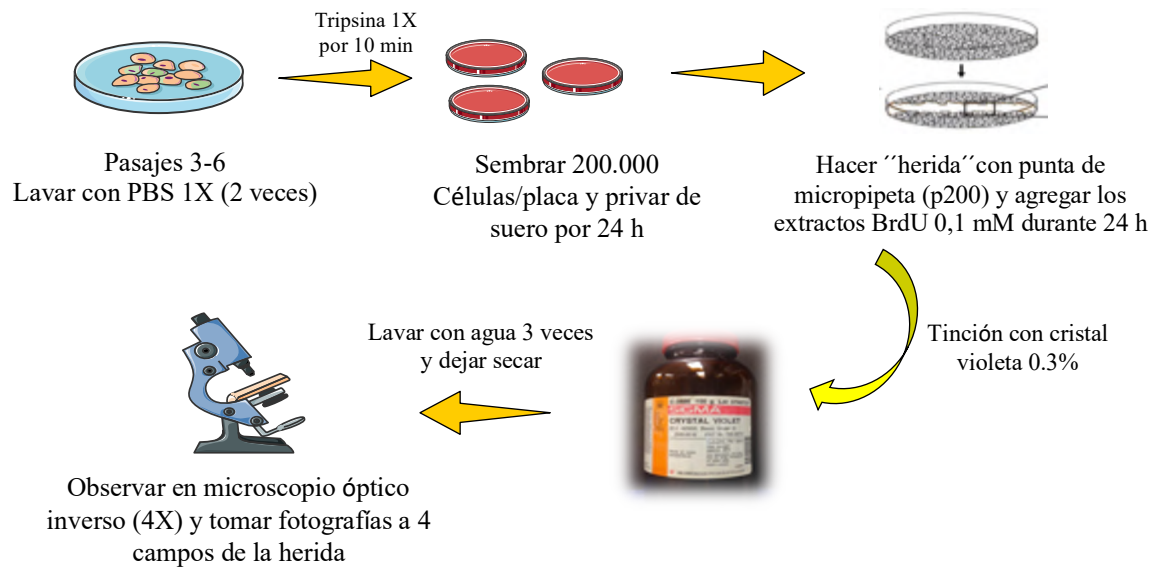


Figura 12. Protocolo de migración celular evaluada mediante el ensayo de la herida (*Scratch assay*)

5.2.6.6. Adhesión celular

La adhesión de los FDHs se evaluó mediante un ensayo donde se cuantificaron las células que quedaron adheridas a una placa de cultivo luego de 2 h de incubación (**Figura 13**). Para ello, se sembraron 150.000 células en placas de 35 mm, las cuales se privaron de suero por 24 h y se les agregaron los extractos a las concentraciones no citotóxicas durante 24 h. Transcurrido este tiempo, las células se soltaron con 300 μ L de tripsina 1X, se suspendieron en 500 μ L de DMEM/F-12 + SFB 10% y se centrifugaron a 1500 rpm por 5 min con el fin de eliminar la tripsina 1X del medio. Se eliminó el sobrenadante y el pellet de células obtenido fue resuspendido en 500 μ L de DMEM/F-12. Inmediatamente, se realizó el conteo celular en una cámara de *Neubauer* para sembrar 60.000 células/pocillo en una placa de 24 pocillos. Este número de células fue definido de acuerdo a una curva de calibración realizada con cristal violeta, en la cual se sembraron FDHs desde 5.000 a 100.000 células/pocillo y se determinó que la concentración óptima de células para cumplir con la ley de beer luego de la tinción era de 60.000 células/pocillo.

Una vez sembradas las células, se incubaron durante 2 h a 37 °C y CO₂ 5%. Luego de este tiempo, se lavaron los pocillos con PBS 1X para remover las células no adheridas. Las células adheridas, por lo tanto, se fijaron y tiñeron con cristal violeta 0,3 % p/v en una solución de etanol 20% v/v durante 20 min, tiempo después del cual se eliminó el excedente de cristal violeta mediante 3 lavados con agua potable. Este proceso se realizó cuidadosamente sumergiendo la placa en una fuente con agua potable y dejándola secar en papel absorbente. Finalmente, se agregó 1 mL de SDS 10% v/v a cada pocillo para disolver y homogenizar la tinción con cristal violeta y se midió la absorbancia en un espectrofotómetro a una longitud de onda de 595 nm.

El número de células adheridas se realizó interpolando el valor de absorbancia obtenido en la ecuación de la recta de la curva con cristal violeta, y el resultado se determinó mediante la razón de **n° de células adheridas tratadas/n° de células adheridas del control negativo**. El control positivo correspondió a los FDHs tratados con SFB 10%.

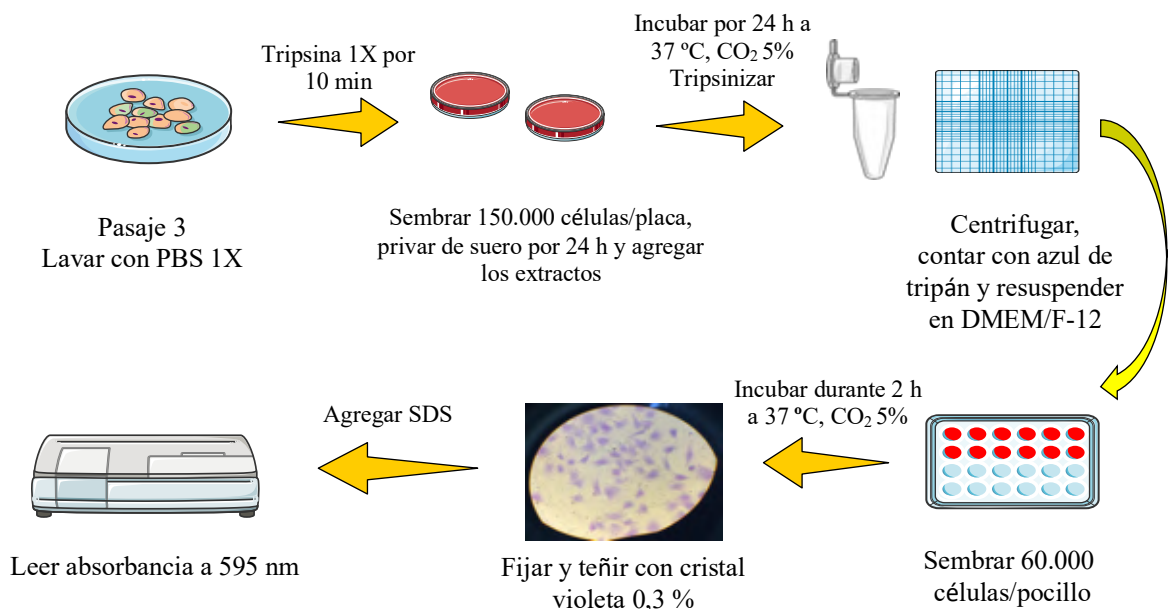


Figura 13. Protocolo del ensayo de adhesión celular de FDHs mediante tinción con cristal violeta

5.2.6.7. Proliferación celular

La proliferación celular se evaluó con las dos concentraciones más altas de cada extracto que no provocaron una disminución en la viabilidad de los FDHs, utilizando el ensayo fluorimétrico con alamarBlue™ tal como se describe en el punto 5.2.6.4 (b). Las células, una vez confluentes, se incubaron con tripsina 1X, se recolectaron y se contaron en una cámara de *Neubauer* para sembrar 30.000 células en una placa de cultivo de 24 pocillos (**Figura 14**). Las células se privaron de suero durante 24 h y se agregaron los extractos a las concentraciones de 1 y 10 µg/mL para los EETs y 0,1 y 1 µg/mL para los EAEs, en presencia y en ausencia de SFB 1 y 10%. El control positivo correspondió a las células tratadas con SFB a estas concentraciones y el control negativo a las células sin suero. Transcurridas 24 h, la placa se leyó en un fluorímetro y el efecto sobre la proliferación se determinó mediante la razón:

$$\text{Proliferación (veces sobre el control)} = \frac{\text{Fluorescencia de células tratadas}}{\text{Fluorescencia control negativo}}$$

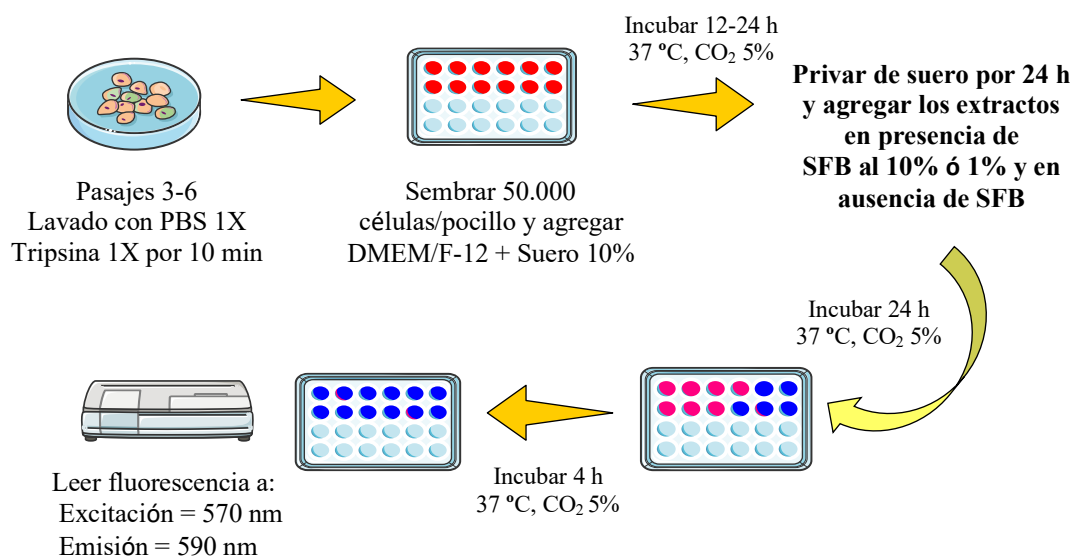


Figura 14. Protocolo para evaluar proliferación celular de FDHs mediante el reactivo de alamarBlue™

5.2.7. EVALUACIÓN DEL EFECTO DE LOS EETs y EAEs SELECCIONADOS SOBRE LA EXPRESIÓN DE PROTEÍNAS DE LA MATRIZ EXTRACELULAR Y SOBRE LA DIFERENCIACIÓN DE FIBROBLASTOS A MIOFIBROBLASTOS.

5.2.7.1. Expresión de los niveles de procolágeno tipo I, colágeno tipo III, fibronectina y α -SMA

Para evaluar los efectos de los extractos seleccionados sobre la expresión de distintas proteínas de la matriz que son sintetizadas por los fibroblastos dérmicos para el proceso de regeneración el tejido dañado, se utilizó la metodología de electroforesis y western blot. Para ello, se prepararon extractos de proteínas totales de FDHs tratados con los EETs y EAEs y con el control positivo TGF- β luego de 72 horas, tiempo en el cual se ha visto una mayor expresión de las proteínas y una mayor diferenciación de fibroblasto a miofibroblasto en experimentos previos realizados en el laboratorio de Farmacología Molecular.

5.2.7.1.1. Viabilidad celular a las 72 h

Previo a la determinación de la expresión de las distintas proteínas, se debió evaluar el efecto de los extractos sobre la viabilidad de los FDHs a los 72 h, disueltos en DMSO 1% y DMSO 0,1% con el fin de determinar si se producía muerte celular luego de este tiempo a las concentraciones utilizadas tanto de extractos como del vehículo. Anteriormente, los ensayos se habían realizado todos en un tiempo de 24 h, por lo que fue necesario evaluar la citotoxicidad luego de 72 h de tratamiento antes de continuar con los siguientes ensayos.

La viabilidad celular se determinó mediante el reactivo de alamarBlue™, el cual se basa en la capacidad de las células metabólicamente activas de convertir el reactivo resazurina en un indicador fluorescente y colorimétrico. Este compuesto es reducido por las células

vivas a resofurina, cuya cantidad es proporcional al número de células viables y puede cuantificarse mediante fluorimetría (excitación entre 530 y 560 nm y emisión a 590 nm) o por espectrofotometría (mediciones de absorbancia a 570 nm y 600 nm) (Rampersad, 2012). Las células se incubaron con tripsina 1X durante 8 min, se recolectaron y se contaron en una cámara de *Neubauer* para sembrar 50.000 células en una placa de 24 pocillos. Se agregaron los extractos a las concentraciones de 1 y 10 µg/mL para los EETs y 0,1 y 1 µg/mL para los EAEs, y se incubó durante 72 h a 37 °C y CO₂ 5%. Los resultados se obtuvieron a través de la medición de fluorescencia de cada grupo tratado, comparado con la señal obtenida por el control negativo según la fórmula:

$$\text{Células viables 72 h (\%)} = \frac{\text{Fluorescencia de células tratadas}}{\text{Fluorescencia control negativo}} \times 100$$

5.2.7.1.2. *Western blot*

a. **Recolección de los extractos de proteínas totales**

De acuerdo al protocolo de la **Figura 15**, las células se sembraron en placas de 60 mm a una densidad de 3×10^5 ó células/pocillo con DMEM/F-12 + FBS 10%. Luego de 24 h, las células se privaron de suero y se dejaron incubando durante al menos 18 h. Pasado este tiempo, se removió el medio celular, se lavaron con PBS 1X y se estimularon con los respectivos extractos a las concentraciones no citotóxicas (1 µg/mL) y disueltos en DMSO a una concentración de 0,1% v/v final. También se trataron células con el control del vehículo (DMSO 0,1%) con el control positivo (TGF-β 10 ng/mL). Luego de 72 h, como se muestra en el protocolo de la **Figura 15**, las células se lavaron tres veces con PBS frío y luego se lisaron con 60 µL de tampón de lisis RIPA (Tris-HCl 10 mM pH 7,2; EDTA 5 mM; NaCl 150 mM; Tritón X-100 1% (v/v); SDS 0,1% (v/v); deoxicolato 1%; aprotinina 20 mg/mL; leupeptina 1 mg/mL; PMSF 1 mM y Na₃VO₄ 1 mM). El homogenizado se centrifugó a 10.000 rpm durante 10 minutos a 4°C. El sobrenadante o extracto de proteínas

se recuperó en un tubo plástico y se determinó la concentración de proteínas por el método de Bradford. Las proteínas fueron denaturadas en tampón de carga 4X (glicerol 20%, β -mercaptoetanol 20%, SDS 5%, 125 mM Tris y 0,1% azul de bromofenol, pH 6,8), para ser almacenadas a -20°C .

b. Electroforesis en geles de poliacrilamida

La separación y resolución de las proteínas se realizó mediante electroforesis en geles de poliacrilamida preparados a partir de una solución de 29,2:0,8 de acrilamida: bisacrilamida, respectivamente. Los geles concentradores fueron de 5% y los geles separadores de 8% para procolágeno I, colágeno III y fibronectina y de 12% para α -SMA. Los geles se cargaron con 25 μg de extracto proteico y la electroforesis se realizó en tampón de electroforesis a un voltaje de 70 V durante 30 min y luego a un voltaje constante de 110 V.

c. Electrotransferencia

Al finalizar la separación de proteínas mediante electroforesis, las proteínas se transfirieron desde el gel de poliacrilamida a una membrana de nitrocelulosa de 0,2 mm de tamaño de poro durante 90 minutos a una corriente constante de 0,35 A en tampón de transferencia.

d. Inmunodetección

Luego de la transferencia de proteínas, se bloquearon las membranas durante 1 h a temperatura ambiente con leche descremada al 5% p/v en constante agitación. Posteriormente, las membranas se incubaron con los anticuerpos primarios disueltos en TBS 1X + Tween-20 al 0,1% (TBS-Tween) durante toda la noche a 4°C y agitación suave. Como control de carga se utilizó β -tubulina o GAPDH y las diluciones y descripciones de los anticuerpos primarios que se utilizaron se presentan en la **Tabla 8**.

Tabla 8. Descripción, peso molecular (kDa) y diluciones de los anticuerpos primarios

Anticuerpo	Descripción	Peso molecular	Dilución
Procolágeno I	COL1A1 rabbit, Cell Signaling	220 kDa	1:2000
Colágeno III	Monoclonal anti-collagen III antibody [EPR17673] Rabbit, Abcam	150 kDa	1:1000
Fibronectina	MA5-11981 antifibronectin mouse, Thermo Fisher	250 kDa	1:1000
α-SMA	α - smooth muscle actin (D4K9N) XP [®] rabbit mAb, Cell Signaling	42 kDa	1:1000
β-tubulina	β -tubulin (9F3) rabbit, Cell Signaling	55 kDa	1:2000
GAPDH	GAPDH (14C10) rabbit mAb, Cell Signaling	37 kDa	1:2000

Transcurrida la incubación con los anticuerpos primarios, las membranas se lavaron durante 30 min en TBS-Tween e incubadas durante 2 h a temperatura ambiente con el segundo anticuerpo anti-IgG de conejo (goat anti-rabbit IgG-HRP 1:5000, Santa Cruz Biotech.) o ratón (goat anti-mouse IgG-HRP 1:5000, Santa Cruz Biotech) según correspondiera, en amortiguador de bloqueo TBS-Tween.

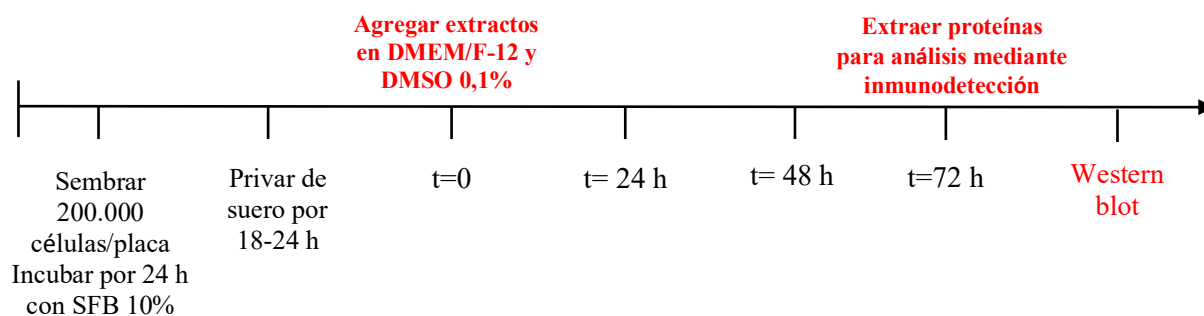


Figura 15. Protocolo del tratamiento de los FDHs para la obtención de proteínas y posterior inmunodetección mediante Western blot

5.2.7.2. Contracción de geles de colágeno

Se evaluó el efecto de los extractos sobre la contracción de geles de colágeno, ya que este ensayo es una herramienta clásica que se utiliza para estudiar la contracción inducida por proteínas de la matriz extracelular, lo cual desempeña un papel importante en la cicatrización de heridas. Los resultados de este ensayo se muestran en esta tesis a pesar de que no fue posible validar la metodología por problemas con el control positivo (TGF- β 10 ng/mL).

Los fibroblastos sembrados a confluencia se soltaron de sus placas de cultivo con tripsina 1X. Posteriormente, se resuspendieron en 2 mL de DMEM/F-12 + SFB 10% traspasando la suspensión de células a un tubo plástico en donde se procedió al conteo celular con azul de tripán. Luego, se centrifugaron los por 5 minutos a 1500 rpm y se descartó el sobrenadante. Las células se resuspendieron en DMEM/F-12 a una densidad de 100.000 células/mL.

Paralelamente, se preparó una solución de colágeno tipo I de cola de rata (50 μ L de PBS 10X, 10 μ L de NaOH 1N, 167 μ L de colágeno I 3X). Se mezclaron 400 μ L de la esta solución de colágeno con 100 μ L de la suspensión de células y junto con ello se agregaron los estímulos correspondientes: EET o EAE a 1 μ g/mL, control vehículo (DMSO 0,1%) y control positivo (TGF- β 10 ng/mL). La mezcla fue incubada en una placa de 24 pocillos, previamente tratada con BSA 2%, por 2 h a 37° C para que se formara el gel de colágeno. Posteriormente, el gel fue soltado de los bordes con una punta de pipeta, se agregaron 500 μ L de DMEM/F-12 y se dejó incubando durante 72 h a 37° C y CO₂ 5%, tiempo en el cual se tomaron fotografías para evaluar la contracción de los geles.

5.2.8. ESTUDIO COMPLEMENTARIO: EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA DE LOS EETs Y EAES SELECCIONADOS

5.2.8.1. Determinación de la concentración mínima inhibitoria (CIM)

Debido a que las heridas cutáneas son susceptibles a la infección por microorganismos patógenos y a que los extractos de hojas de murtila poseen actividad antimicrobiana (Avello et al., 2009), se evaluó el efecto antimicrobiano de los extractos seleccionados de las hojas de murtila sobre bacterias de importancia clínica.

Se determinó la concentración inhibitoria mínima (CIM) de cada extracto a través del método de microdilución en caldo según el protocolo de Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI, 2012), frente a las cepas bacterianas ATCC correspondientes a: *Staphylococcus aureus* (ATCC 29213), methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (ATCC 43300), *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 27853), *Escherichia coli* (ATCC 25992) y *Klebsiella pneumoniae* (ATCC 700603). En microplacas de 96 pocillos de fondo en U se agregaron 100 µL de caldo Mueller Hinton como medio de cultivo, los extractos a concentraciones finales de 1.0 - 512-µg/mL para los EETs y 0.5 – 256 µg/mL para los EAES y se inocularon 100 µL de suspensión de bacterias. Los controles positivos correspondieron a vancomicina (0,016–8 µg/mL) para las bacterias Gram (+) y gentamicina (0,008-4 µg/mL) para las bacterias Gram (-). La suspensión de microorganismos que se utilizó en cada inoculación se preparó a partir de cultivos frescos de bacterias a una concentración de 0,5 McFarland, equivalentes a 10⁸ UFC (unidades formadoras de colonia), la cual se diluyó hasta 10⁵ UFC. Por último, las placas inoculadas se incubaron durante 24 h, tiempo en el cual se determinó la CIM para cada muestra mediante el registro de la concentración de los pocillos en los cuales no se observó crecimiento de colonias.

5.2.9. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Para el análisis estadístico de los resultados obtenidos en los distintos ensayos se utilizó el programa GraphPad Prism (2016). La normalidad de los datos se determinó aplicando el test de Shapiro-Wilk y la significancia estadística se evaluó mediante ANOVA de una vía, seguido del test de comparaciones múltiples de Tukey para el análisis de grupos o el test de Dunnett para comparar resultados de las muestras versus el control, considerándose la significancia para valores de $p < 0,05$.

La linealidad de las curvas de calibración se determinó aplicando el *Run Test* de regresión lineal del programa GraphPad Prism, el cual define si los datos difieren significativamente de una línea recta al ponerlos en orden. Un $p > 0.05$ indica que los datos se ajustan a un modelo lineal.

VI. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

6.1. SELECCIÓN DE LOS EETs Y EAES DE DISTINTOS GENOTIPOS DE MURTILLA Y DIFERENCIADOS POR SU COMPOSICIÓN QUÍMICA

6.1.1. Contenido fenólico total y contenido de taninos totales en los EETs y EAES de las hojas de *U. molinae* recolectadas en el año 2013

El CFT y el CTT de los EETs₂₀₁₃ y EAES₂₀₁₃ se determinó debido a que los polifenoles, tanto flavonoides como taninos, han demostrado poseer actividad cicatrizante en estudios *in vitro* (Lai et al., 2016; Moghadam et al, 2017). Los EETs y EAES de los 10 genotipos presentaron diferencias significativas tanto en los resultados del CFT como del CTT (**Tabla 9**) y de acuerdo con los gráficos que se muestran en la **Figura 16**, los EETs de las hojas de murtila concentran en mayor proporción los compuestos fenólicos en comparación a los EAES, siendo el EET G. ZF-18 el que exhibió el mayor CFT y el mayor CTT ($261,8 \pm 2,6$ y $201,0 \pm 1,6$ mg EAT/g ES, respectivamente). Por otro lado, el EET correspondiente al genotipo 19-2 fue el EET con menor CFT y menor CTT ($162,6 \pm 1,0$ y $87,7 \pm 0,6$ mg EAT/g ES, respectivamente).

Respecto al CTT de los EAES, el mayor valor fue el obtenido desde las hojas del genotipo 31-1 (G.31-1) ($37,1 \pm 0,1$ mg EAT/ g ES), mientras que el CFT nuevamente fue mayor en el EAE del G. ZF-18 ($104,5 \pm 1,3$ mg EAT/ g ES). Es importante destacar que al comparar el CTT vs CFT, se puede concluir que en los EETs los taninos fueron los compuestos polifenólicos mayoritarios en las hojas de murtila. Otros polifenoles, como flavonas y flavonoles, se encuentran en un porcentaje que varía entre un 3-5 % p/p en los EETs, y dichos metabolitos secundarios están presentes en una concentración muy inferior en comparación a los taninos (Peña-Cerda et al., 2017).

La mayor cantidad de compuestos polifenólicos de tipo taninos presente en los EETs se puede explicar debido a la solubilidad de estos compuestos en solventes polares próticos. Se ha determinado que compuestos con mayor cantidad de grupos hidroxilo pueden formar puentes de hidrógeno con el oxígeno de solventes como etanol, metanol y acetona, por lo que son extraídos con mayor eficiencia por estos solventes (Galanakis et al., 1982).

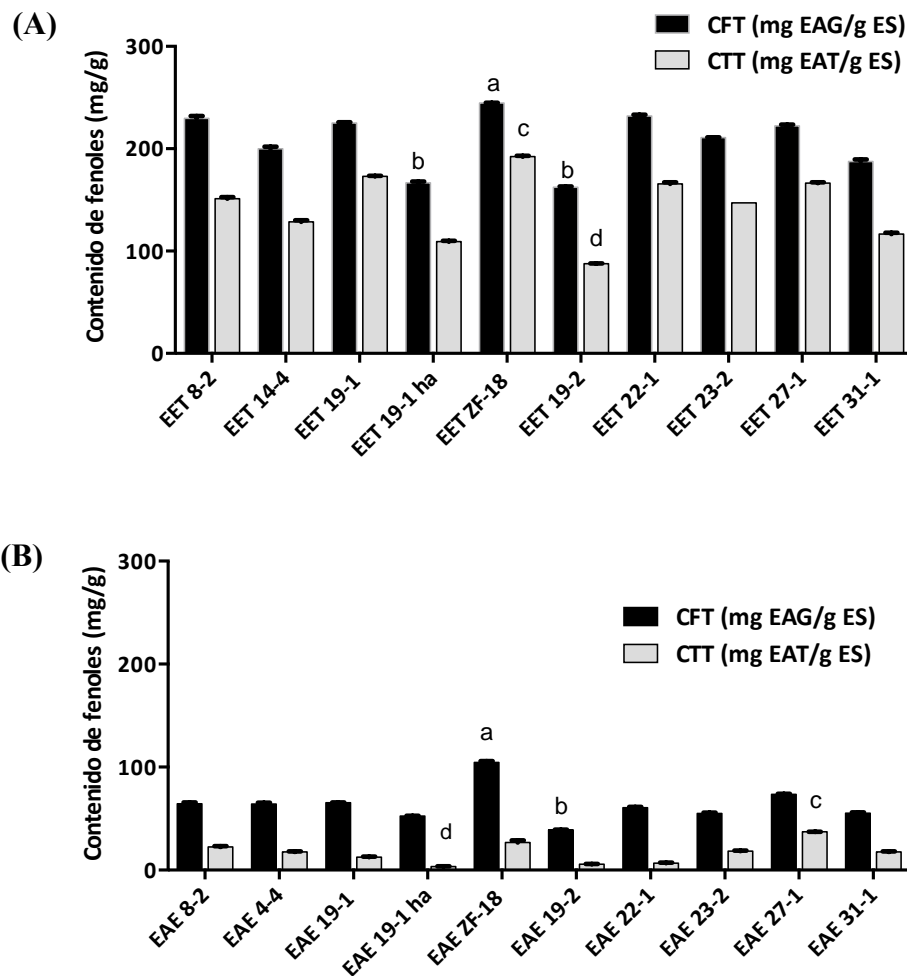


Figura 16. Contenido fenólico total (CFT) y contenido de taninos totales (CTT) de los 10 EETs (A) y EAEs (B) obtenidos de las hojas de murtila del año 2013 de distintos genotipos. Letras a y b indican el mayor y menor valor de CFT, respectivamente. Letras c y d indican el mayor y menor valor obtenido en el CTT, respectivamente. Letras iguales indican que no existen diferencias significativas entre los extractos de un mismo grupo ($p > 0,05$). Los resultados son el promedio \pm DE ($n=3$) de los valores obtenidos para los EETs y EAEs de

cada genotipo y el análisis estadístico se realizó mediante ANOVA de una vía y el test de comparaciones múltiples de Tukey. El CFT está expresado en mg equivalentes de ácido gálico por g de extracto seco (mg EAG/g ES) y el CTT en mg equivalentes de ácido tánico por g de extracto seco (mg EAT/g ES).

Tabla 9. Contenido fenólico total (CFT) y Contenido de taninos totales (CTT) de los EETs y EAEs obtenidos de las hojas de murtila del año 2013 de distintos genotipos

Accesión del genotipo	CFT		CTT	
	EETs	EAEs	EETs	EAEs
8-2	229,9 ± 2,9 ^a	64,4 ± 1,3 ^a	151,2 ± 2,6 ^a	22,1 ± 0,7 ^a
14-4	199,9 ± 3,4 ^b	64,1 ± 1,2 ^{ab}	128,6 ± 2,8 ^b	17,8 ± 0,7 ^b
19-1	226,0 ± 1,6 ^a	65,3 ± 0,4 ^{ab}	173,1 ± 0,9 ^c	12,6 ± 0,4 ^c
19-1 ha	167,0 ± 2,7 ^c	52,3 ± 0,4 ^c	109,4 ± 1,2 ^d	3,4 ± 0,2 ^d
ZF-18	261,8 ± 2,6 ^d	104,5 ± 1,3 ^d	201,0 ± 1,6 ^e	33,6 ± 0,8 ^e
19-2	160,5 ± 1,5 ^c	39,0 ± 0,3 ^e	87,7 ± 0,6 ^f	5,6 ± 0,6 ^f
22-1	231,2 ± 0,6 ^a	60,5 ± 0,9 ^f	165,8 ± 2,5 ^g	6,7 ± 0,4 ^f
23-2	210,6 ± 1,4 ^e	54,9 ± 0,7 ^c	147,2 ± 0,2 ^h	18,4 ± 0,6 ^b
27-1	220,0 ± 2,7 ^a	73,5 ± 0,6 ^h	166,4 ± 1,4 ^g	31,1 ± 0,1 ^g
31-1	187,6 ± 4,0 ^f	55,4 ± 0,7 ^c	116,7 ± 4,2 ⁱ	17,7 ± 0,7 ^b

CFT: Contenido Fenólico Total. CTT: Contenido de Taninos Totales. El CFT se encuentra expresado en mg equivalentes de ácido gálico (EAG) por g de extracto seco (ES) ± DE y el CTT en mg equivalentes de ácido tánico (EAT) por g de extracto seco (ES) ± DE. Letras iguales indican que no hay diferencia significativa ($p > 0,05$) entre los promedios ($n=3$) de los valores obtenidos para cada EET en cada columna, calculado con ANOVA de una vía y test de comparaciones múltiples de Tukey.

6.1.2. Contenido de triterpenos pentacíclicos (TPCs) de los EAEs de los 10 genotipos de murtila

Como se mencionó previamente, el resultado del contenido de TPCs de los EETs y EAEs de las hojas recolectadas en el año 2013 de los 10 genotipos de murtila se obtuvo mediante la técnica de CLAE-DAD en una tesis de doctorado de nuestro laboratorio y se encuentran publicados en el trabajo de Arancibia-Radich et al. (2016). De acuerdo a estos resultados, los cuales se resumen en el **ANEXO 4**, se concluyó que los EAEs de los genotipos ZF-18 y 19-2 eran los candidatos más óptimos para conformar el grupo de extractos diferenciados por su contenido de TPCs (grupo 2). Estos extractos obtuvieron diferencias estadísticamente significativas en el contenido de ácido asiático y de ácido madecásico,

siendo el EAE G. 19-2 el que obtuvo la mayor concentración de estos compuestos ($9,7 \pm 2,0$ g ácido asiático/ 100 g ES). En ambos extractos, además, se encuentran presente los ácidos corosólico, maslínico y la mezcla de ácido ursólico/oleanólico, sin embargo, en el EAE G. 19-2 no fue posible cuantificar ácido alfitólico, a diferencia del EAE G. ZF-18 que obtuvo $4,0 \pm 0,1$ g/g ES de este triterpeno, expresado en ácido betulínico. En los EETs de los genotipos seleccionados también se determinó la presencia de algunos TPCs; sin embargo, su concentración fue inferior a la de los EAES.

6.1.3. EETs y EAES seleccionados para conformar los grupos 1 y 2

Considerando los resultados anteriores, fueron seleccionados los EETs y EAES de los genotipos ZF-18 y 19-2. Estos extractos obtuvieron diferencias significativas en su composición química, destacando el EET G. ZF-18 por presentar la mayor cantidad de compuestos fenólicos, principalmente de taninos, y el EAE 19-2, el cual presentó la mayor concentración de ácido asiático y ácido madecásico.

6.2. CARACTERIZACIÓN QUÍMICA DEL EET Y EAE DE LAS HOJAS DE MURTILLA DEL GENOTIPO CON MAYOR CONTENIDO DE POLIFENOLES (G. ZF-18) Y COMPARACIÓN ENTRE LOS EXTRACTOS DE HOJAS DE DISTINTOS AÑOS DE RECOLECCIÓN

6.2.1. Obtención de los extractos seriados de las hojas del G. ZF-18₂₀₁₅

El material vegetal utilizado correspondió a hojas de murtilla del G. ZF-18 recolectadas en el mes de mayo del año 2015, misma época en la fueron recolectadas las hojas previamente estudiadas en nuestro laboratorio de este mismo genotipo. Esto se realizó con el fin de disminuir las variables que podrían afectar el rendimiento y composición fenólica y triterpénica de los EAE y EET, dejando como la variable más importante el año de recolección (2013 v/s 2015). Por otro lado, cabe destacar que se eligió el mes de mayo para la recolección de las hojas ya que esta temporada coincide con la fecha en la que se

cosechan los frutos de murtila, los cuales tienen un gran interés comercial debido a que son exportados y también consumidos en nuestro país. Un retiro de las hojas en la época de floración podría afectar el desarrollo de las bayas. Por otro lado, cabe mencionar que para el Laboratorio de Productos Naturales el estudio de las hojas tiene una gran importancia porque ha permitido proporcionar un valor agregado a la explotación comercial de esta especie nativa, principalmente porque las hojas son desechadas una vez que son recolectados los frutos y actualmente no poseen un valor comercial importante. La investigación con las hojas de murtila realizada en nuestro laboratorio, por lo tanto, ha demostrado a la fecha diversas propiedades farmacológicas, como propiedades antiinflamatorias tópicas, antioxidantes y neuroprotectoras (Delporte et al., 2007, Peña-Cerda et al., 2017, Rubilar et al., 2006; Rubilar et al., 2011; Avello et al., 2013; Hauser et al., 2014, Jara-Moreno D. et al., 2017).

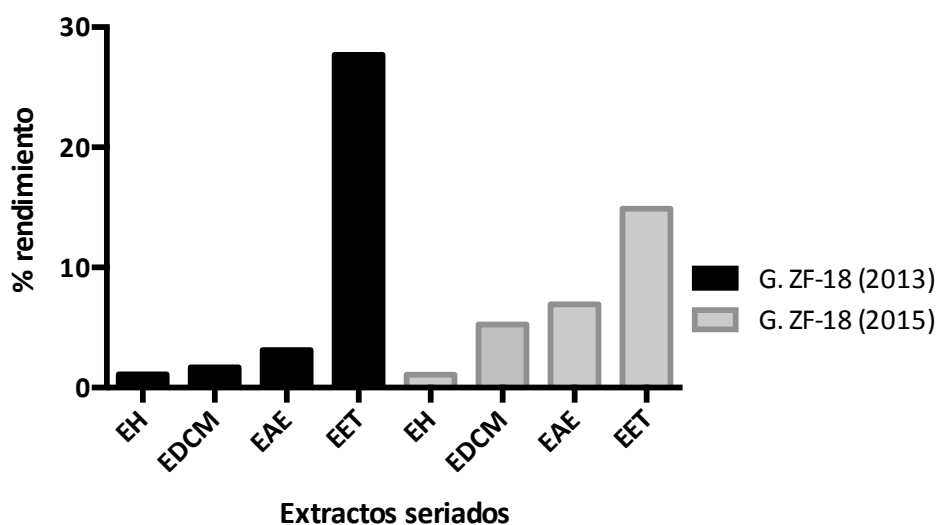


Figura 17. Rendimiento comparativo de los extractos seriados de las hojas de murtila del del G. ZF-18₂₀₁₃ y G. ZF-18₂₀₁₅. EH: extracto hexánico, EDCM: extracto de diclorometano, EAE: extracto de acetato de etilo, EET: extracto etanólico

Respecto al rendimiento de los extractos seriados de las hojas recolectadas en mayo del año 2015, el EET fue el extracto que mostró el mayor rendimiento, seguido por el EAE

(Figura 17). Estos resultados se correlacionan con los rendimientos del EET vs EAE demostrado por Peña-Cerda et al. (2017) para las hojas de este mismo genotipo, pero que fueron recolectadas en mayo de 2013. Sin embargo, el rendimiento del EET fue menor en aproximadamente un 50% en relación al del año 2013, lo cual se podría explicar, en parte, por el efecto del año de recolección. De acuerdo al Informe del Estado del Ambiente del año 2016 (Ministerio del Ambiente, Chile) las temperaturas, tanto máximas como mínimas, fueron mayores en el año 2013 respecto al año 2015. Esta situación podría explicar parte de los resultados, dado que las variaciones en la temperatura es uno de los factores que influye en el contenido de metabolitos secundarios de un organismo vegetal. Se ha determinado que el contenido de compuestos fenólicos en las hojas de distintas especies vegetales varía dependiendo de las condiciones ambientales, como las temperaturas extremas, la altura, las lluvias, la radiación ultravioleta, entre otros factores (Cao et al., 2019). En particular, los tejidos de plantas expuestas a temperaturas más bajas están asociados con concentraciones más altas de polifenoles, lo que podría estar relacionado con el aumento de la actividad de la fenilalanina amoniliasa (PAL) a temperaturas más bajas, una enzima importante en la biogénesis de varios compuestos fenólicos (Sampaio et al., 2011). Por otro lado, las temperaturas altas y la exposición a la luz solar también se ha asociado a una mayor cantidad de compuestos fenólicos, lo cual se explica posiblemente a mecanismos fotoprotectores utilizados por la planta para la protección de las capas epidérmicas contra el exceso de radiación (Chua et al., 2015).

6.2.2. Análisis químico del EET y EAE de las hojas del G. ZF-18₂₀₁₅

Se realizó el análisis de los compuestos fenólicos y de TPCs del EET y EAE obtenidos de las hojas del G.ZF-18₂₀₁₅ con el fin de caracterizarlos y correlacionar su composición química con los estudios biológicos realizados en esta tesis. Además, se compararon los resultados de estos nuevos extractos con los resultados obtenidos por los EET y EAE del G. ZF-18 del año 2013.

También, se realizó una comparación con los resultados del estudio químico del EET y EAE obtenidos desde las hojas del G.19-2 con el objetivo de determinar una posible correlación entre la composición química de ambos genotipos y los efectos sobre las funciones de fibroblastos dérmicos humanos asociadas a cicatrización.

Los resultados de los estudios realizados con los extractos del G. ZF-18₂₀₁₃ que se utilizaron para la creación de los gráficos comparativos con los extractos del año 2015, se obtuvieron a partir de los datos obtenidos en mi memoria de pregrado (Valenzuela-Bustamante, 2015).

6.2.2.1. Determinación del contenido fenólico total (CFT) y contenido de taninos totales (CTT) mediante el reactivo de Folin-Ciocalteu

Se realizó la cuantificación del contenido de fenoles y taninos totales del EET y EAE de las hojas del G-ZF-18₂₀₁₅ con el fin de comparar los resultados con los obtenidos por los extractos del año 2013. En la **Figura 18** se muestran los valores obtenidos por los extractos de ambos años mediante el ensayo de Folin-Ciocalteu, siendo nuevamente el EET quien concentró en mayor proporción los compuestos fenólicos. Respecto al CFT no hubo diferencias significativas entre los EAES de ambos años, sin embargo, el CFT del EET₂₀₁₅ fue aproximadamente un 15% menor que el EET₂₀₁₃, lo cual podría correlacionarse, en parte, con el menor rendimiento obtenido por este extracto. A pesar de ello, el valor del CFT del EET₂₀₁₅ ($222,1 \pm 2,2$ mg EAG/ g ES) sigue siendo uno de los más altos en comparación con los otros nueve genotipos analizados previamente en nuestro laboratorio (Peña et al., 2017). En relación al CTT del EET₂₀₁₅ ($192,4 \pm 1,2$ mg EAT/ g ES), el cual se determinó mediante la separación de los otros compuestos fenólicos mediante precipitación con gelatina, el valor no presentó diferencias estadísticamente significativas con el CTT del EET₂₀₁₃ y fue alrededor de siete veces mayor que el EAE₂₀₁₅ ($26,7 \pm 2,0$ mg EAT/ g ES).

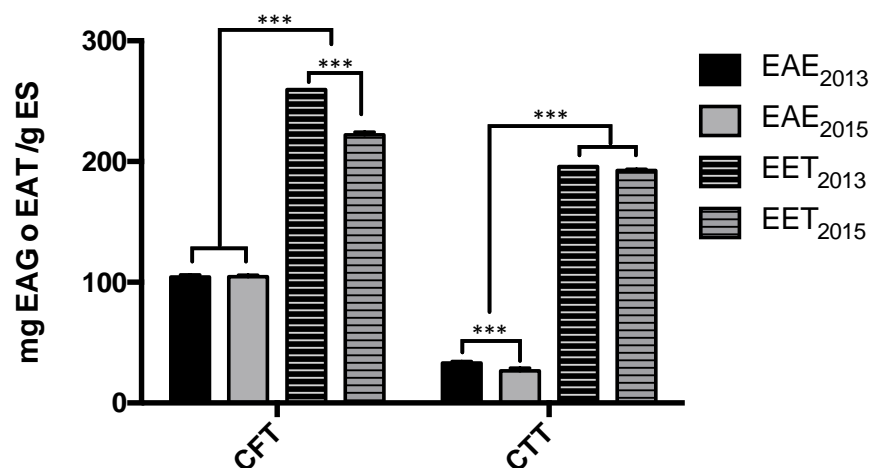


Figura 18. Contenido fenólico total (CFT) y contenido de taninos totales (CTT) de los EETs y EAEs obtenidos de hojas de murtillo del G. ZF-18₂₀₁₃ y G. ZF-18₂₀₁₅. Los resultados se obtuvieron mediante la metodología de Folin-Ciocalteu y, en particular, el CTT se determinó separando los taninos de los otros compuestos fenólicos mediante precipitación con gelatina. Los valores (n=3) se expresan como mg equivalentes de ácido gálico por g de extracto seco (mg EAG/ g ES) para el CFT y como mg equivalentes de ácido tánico por g ES para el CTT (mg EAT/ g ES). El análisis estadístico se realizó mediante ANOVA de dos vías para comparación de grupos y el test de comparaciones múltiples de Tukey donde ***p<0.001

De acuerdo a los resultados, tanto el EET como el EAE del G. ZF-18₂₀₁₅ cumplen con los requisitos de selección en relación al contenido fenólico, ya que a pesar de que las hojas se recolectaron en un año distinto, el genotipo mostró valores altos tanto en el CFT como en el CTT. Estos resultados, además, siguen siendo más altos que el CFT y el CTT de los obtenidos por el EET G.19-2, el cual exhibió el menor CFT (162,6 ± 1,0 mg EAG/g ES) y el menor CTT (87,7 ± 0,6 mg EAT/g ES) en comparación con los EET y EAE de otros genotipos analizados por Peña-Cerda et al. (2017).

6.2.2.2. Determinación del contenido de flavonas y flavonoles (CFF)

Se cuantificó el contenido de flavonoides mediante el ensayo colorimétrico con AlCl₃ con la finalidad de comparar los resultados encontrados al analizar los EAE y EET del G. ZF-18₂₀₁₅ con los EET y EAE obtenidos desde las hojas recolectadas del G. ZF-18₂₀₁₃. De

acuerdo con los resultados mostrados en la **Figura 19**, hubo diferencias significativas entre el contenido de flavonas y flavonoles del EAE₂₀₁₅ ($62,2 \pm 1,7$ mg EQ/g ES), en comparación con el EAE₂₀₁₃ ($32,7 \pm 0,5$ mg Q/g ES). Por lo tanto, en ambos años de recolección de las hojas del G.ZF-18, los flavonoides se encuentran concentrados en mayor proporción en el EAE. Estos resultados dan una estimación del tipo de compuestos que se encuentran presente en ambos extractos, siendo los compuestos de mayor polaridad, como los taninos, los que están en mayor proporción en los EETs y los compuestos fenólicos de tipo flavonoide en los EAEs.

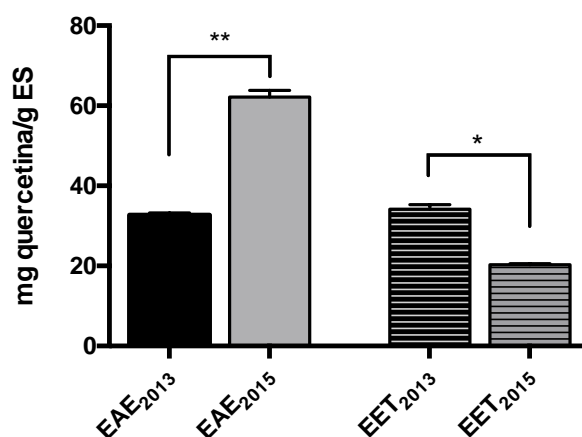
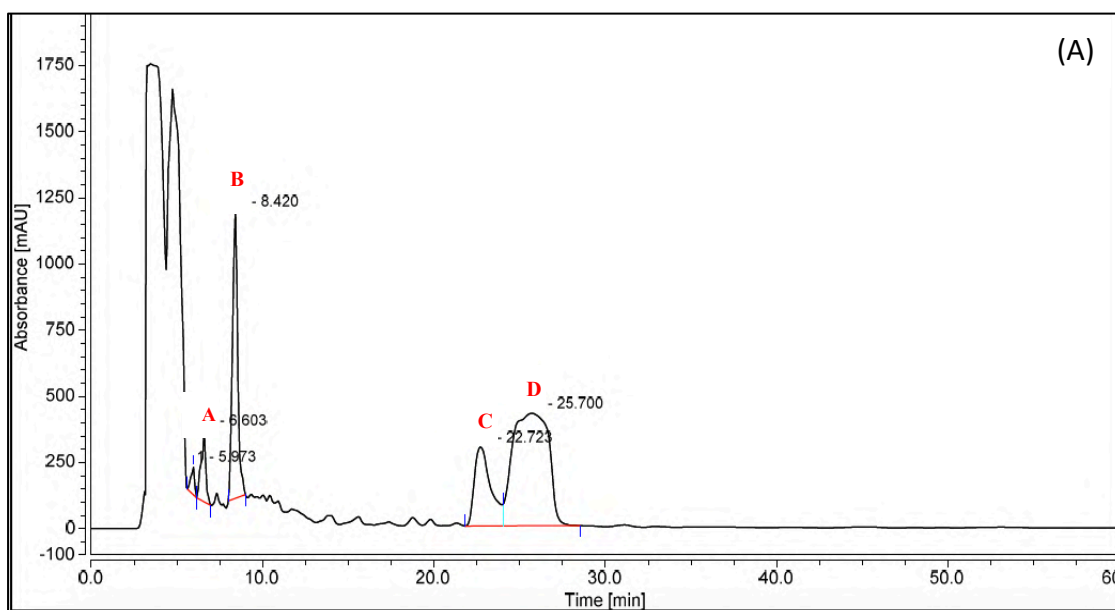


Figura 19. Concentración de flavonas y flavonoles en los EETs y EAEs de las hojas de murtila del G. ZF-18₂₀₁₃ y G. ZF-18₂₀₁₅. La cuantificación se realizó mediante el método colorimétrico con AlCl₃ y resultados (n=3) se expresan como mg equivalentes de quercetina por g de extracto seco (mg EQ/g ES + DE). El análisis estadístico se realizó mediante ANOVA de una vía y el test de comparaciones múltiples de Tukey donde **p<0,01 y *p<0,05.

6.2.2.3. Cuantificación de triterpenos pentacíclicos (TPCs) mediante CLAE-DAD

Se cuantificó el contenido de TPCs de los EET y EAE del G. ZF-18₂₀₁₅ mediante CLAE-DAD, utilizando la metodología desarrollada previamente en el Laboratorio de Productos Naturales para caracterizar los EAEs y EETs de los distintos genotipos de murtila estudiados (Arancibia-Radich et al., 2016). En este caso, se construyeron curvas de

calibración con patrones de: i) ácido asiático ($y = 0,4525X + 0,4523$; $R = 0,9950$; *run test* de linealidad $p > 0,05$), ii) ácido oleanólico ($y = 0,4476X - 0,6100$; $R = 0,9945$; *run test* de linealidad $p > 0,05$) y iii) ácido ursólico ($y = 0,4438X + 0,1166$; $R = 0,9804$; *run test* de linealidad $p > 0,05$). Los TPCs fueron identificados comparando los tiempos de retención (t_r) y los espectros UV con los patrones. Los TPCs que no fue posible identificarlos con patrones debido a que no se encontraban disponibles, fueron comparados con los cromatogramas obtenidos previamente en nuestro laboratorio bajo las mismas condiciones cromatográficas (Arancibia-Radich et al., 2016). Así, el contenido de ácido madecásico se expresó como mg equivalentes de ácido asiático/100 g de extracto seco (ES), el ácido corosólico se expresó en mg de ácido ursólico/100 g ES, el ácido maslínico se expresó como mg ácido oleanólico/100 g ES y la mezcla de los ácidos ursólico y oleanólico se expresó en mg equivalentes de ácido ursólico.



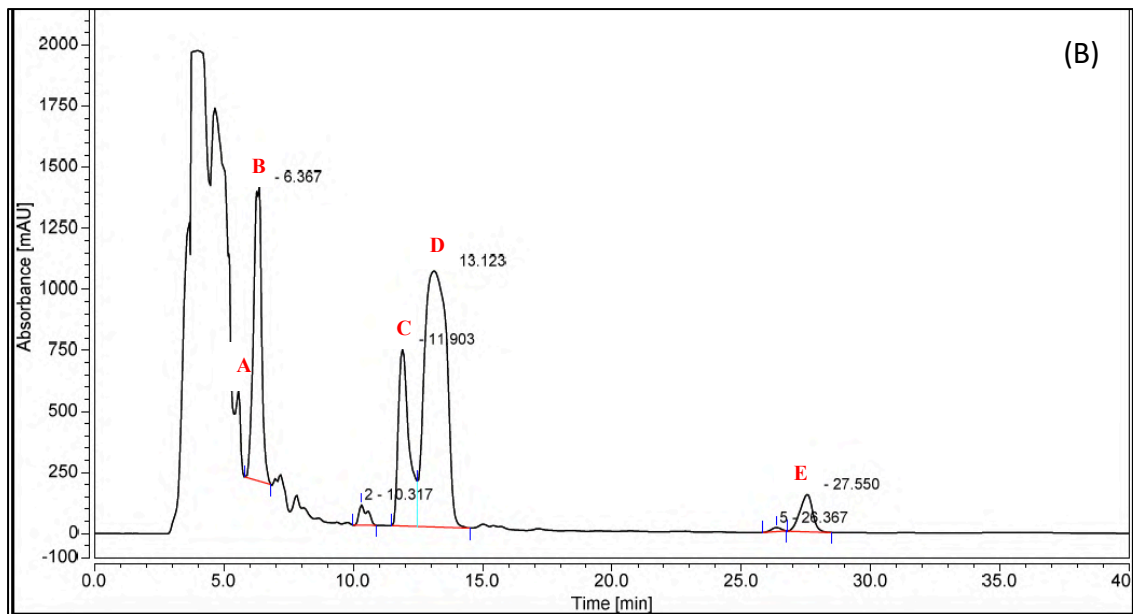


Figura 20. Cromatogramas de triterpenos pentacíclicos del EAE G. ZF-18₂₀₁₅ obtenidos mediante CLAE-DAD (201 nm), utilizando como fase móvil A) acetonitrilo: ácido fórmico 0,1% (60:40) y B) y acetonitrilo:ácido fórmico 0.1% 75:25. La separación cromatográfica se realizó con un flujo isocrático de 0,6 L/min y longitud de detección de detección a 201 nm (n = 3). A: ácido madecásico, B: ácido asiático, C: ácido corosólico, D: ácido maslínico, E: mezcla de los ácidos ursólico y oleanólico.

De acuerdo con los resultados que se muestran en la **Figura 20** y en la **Tabla 10**, fue posible identificar cinco TPCs que se encuentran concentrados principalmente en el EAE del G. ZF-18₂₀₁₅, lo cual se explica principalmente porque la solubilidad de estos compuestos es mayor en acetato de etilo que en solventes más polares como etanol o metanol (Jie-Ping et al., 2011). En el EET de este mismo genotipo fue posible cuantificar solamente los ácidos asiático y maslínico (**ANEXO 5**), los cuales corresponden a los TCPs más abundantes del EAE. Respecto al ácido betulínico, el cual es un metabolito secundario que sólo se ha encontrado en hojas de murtila silvestre (Aguirre et al., 2007; Göity et al., 2013), tampoco fue posible identificarlo mediante CLAE-DAD en los extractos del G. ZF-18, tanto de las hojas del año 2013 como en las del año 2015, así como tampoco se identificó en los EAES y EETs de otros genotipos de murtila (Arancibia-Radich et al., 2016).

Con estos resultados fue posible demostrar que la composición triterpénica de los EAEs y EETs de los G. ZF-18₂₀₁₃ vs G. ZF-18₂₀₁₅ es similar, diferenciándose sólo en las concentraciones de cada TPC. De acuerdo con los resultados de la tesis doctoral de Peña-Cerda (2016), las concentraciones de ácido corosólico ($11,8 \pm 0,6$ % m/m) y la mezcla de los ácidos oleanólico y ursólico ($18,3 \pm 1,0$ % m/m) del EAE₂₀₁₃ son mayores a las cuantificadas en el EAE₂₀₁₅, sin embargo, la concentración de ácido maslínico fue similar. Respecto a los ácidos madecásico y asiático, los cuales tienen un especial interés para esta tesis debido a que se ha determinado que son unos de los compuestos activos de las hojas de *Centella asiática* ya que presentan actividad cicatrizante (Hashim et al., 2011), se determinó que su concentración fue mayor en el EAE₂₀₁₅ para ambos compuestos ($1,71 \pm 0,12$ y $8,42 \pm 0,14$ % m/m, respectivamente), en comparación a las concentraciones de ácido madecásico y de ácido asiático reportadas en el EAE₂₀₁₃ ($0,4 \pm 0,0$ y $6,2 \pm 0,1$ % m/m, respectivamente). Sin embargo, la concentración de ácido asiático en el EET₂₀₁₅ fue menor.

Cabe destacar que las diferencias en el contenido de TPCs de los EAE y EET tanto del G. ZF-18₂₀₁₅ como del G. ZF-18₂₀₁₃ respecto de los EAE y EET del G. 19-2 (Peña-Cerda, 2016) fue significativa, por lo que los extractos cumplen el criterio de selección determinado en el anteproyecto de esta tesis, donde se consideró seleccionar dos genotipos con distinta composición química, tanto en el contenido de fenoles y taninos totales, como en el contenido de TPCs.

Tabla 10. Contenido de triterpenos pentacíclicos (TPCs) del EET y EAE de las hojas de murtila del G. ZF-18₂₀₁₅

Genotipo	Triterpenos pentacíclicos identificados por CLAE-DAD					
	Hojas G. ZF-18 ₂₀₁₅	Ácido madecásico*	Ácido asiático	Ácido corosólico**	Ácido maslínico***	Ácido oleanólico y ursólico**
EET		N.D	0,14 ± 0,01	N.D	0,25 ± 0,01	N.D.
EAE		1,71 ± 0,12	8,42 ± 0,14	6,98 ± 0,54	17,24 ± 2,44	2,20 ± 0,14

Valores del contenido de TPCs en los EET y EAE del G. ZF-18₂₀₁₅ expresados como %m/m de extracto seco ± DE (n=3). *Concentración expresada en equivalentes de ácido asiático. **Concentración expresada en equivalentes de ácido ursólico. ***Concentración expresada en equivalentes de ácido oleanólico. N.C.: valor no cuantificable o pico no detectado en el cromatograma. Los valores mayores para cada triterpeno se encuentran en negrita.

6.2.2.4. Identificación de compuestos fenólicos mediante CLAE-UV-EM/EM

Entre los principales compuestos fenólicos que se han sido identificados en las hojas de murtila, tanto del G. ZF-18 como de murtilas silvestres, se encuentran principalmente derivados de ácido elágico y gálico, flavonoides como quercetina, miricetina y canferol y distintos derivados glicosilados (Rubilar, et al., 2006; Avello et al., 2013; Peña-Cerda et al., 2017; Jara- Moreno et al., 2018). Para determinar las condiciones cromatográficas y el perfil fenólico del EAE y EET de las hojas del G. ZF-18₂₀₁₅, los extractos se analizaron en un equipo CLAE-DAD a 280 y 360 nm como longitudes de onda detección UV. Posteriormente, se analizaron en un espectrómetro de masas en tándem con el objetivo de identificar los principales compuestos fenólicos presentes en ambos extractos. Los datos obtenidos de los espectros MS/MS, tanto en modo de ionización positivo como negativo, se procesaron en la plataforma en línea *Global Natural Products Social Molecular Networking* (GNPS), una plataforma gratuita que permite identificar compuestos desconocidos a partir de la comparación de sus espectros EM/EM con los espectros de las librerías disponibles en la plataforma. Para ello, se realizó un análisis por derreplicación de alto rendimiento y también se crearon redes moleculares entre los compuestos de ambos extractos (Wang M. et al., 2016).

6.2.2.4.1. Identificación de compuestos fenólicos mediante derreplicación de alto rendimiento (*High-Throughput Dereplication*)

En la **Tabla 11** se presentan los resultados de los compuestos identificados tentativamente por CLAE-EM/EM en el EET y EAE del G. ZF-18₂₀₁₅, utilizando los datos obtenidos por derreplicación (*High-Throughput Dereplication*) en la plataforma GNPS o, en caso de no haber logrado identificarlos con esta metodología, se utilizó la comparación con bibliografía de los fragmentos más abundantes de los espectros EM/EM. En esta tabla se muestra el tiempo de retención (t_r), el modo de ionización, los fragmentos (m/z) más importantes que coincidieron de la molécula derreplicada o de la comparación por bibliografía, el valor *cosine* que demuestra el grado de similitud entre los espectros y una semicuantificación realizada con las áreas de los picos del ion precursor identificados en ambos extractos.

Se lograron identificar 6 compuestos en modo positivo y 30 compuestos en modo negativo. Entre los últimos, se encuentra la trehalosa ($t_r=3,9$ min), un disacárido no reductor que no había sido identificado anteriormente en las hojas de murtila y que se encuentra presente tanto en el EET como en el EAE del G. ZF-18₂₀₁₅. En general, los compuestos presentes en los extractos analizados de las hojas de murtila se pueden dividir en cuatro grupos: 1) ácidos fenólicos y sus derivados, 2) taninos hidrolizables, 3) flavonoles y 4) heterósidos flavónicos.

Entre los compuestos más abundantes del EET identificados en polaridad negativa se encuentran los que se separaron en los primeros minutos del cromatograma a 280 nm, principalmente ácidos fenólicos y taninos hidrolizables. Entre ellos, destaca el ácido quínico ($t_r= 4,4$ min), taninos elágicos como los isómeros de HHDP-glucosa ($t_r= 4,4$ y $4,8$ min), galocatequina ($t_r= 4,5$ min), ácido digaloilquínico ($t_r= 4,6$ min) y ácido gálico ($t_r= 5,9$ min) y sus derivados. Los tiempos de retención de estos compuestos coinciden, en su mayoría, con el pico de mayor área bajo la curva (ABC) observado en el cromatograma del perfil fenólico por CLAE de la **Figura 22-A** ($t_r=4,7$ min) a 280 nm, por lo que no es

posible asociar este pico a un compuesto en particular, sino que, probablemente, esté conformado por más de una molécula. Esto también explicaría la gran diferencia entre el resultado del CFT determinado mediante la técnica de Folin-Ciocalteu, el cual fue aproximadamente el doble en el EET en comparación al EAE, así como también lo fue el ABC del pico con $t_r=4,7$ min.

Tabla 11. Identificación tentativa de los compuestos presentes en el EET y EAE del G. ZF-18₂₀₁₅ mediante CL-EMⁿ

Identificación tentativa	t _r (min)	Precursor (m/z)	Modo ionización	Cosine*	Fragmentos más abundantes			Semicuantificación**		Referencia
					EM ² (m/z)	EET	EAE	EET	EAE	
1 Trehalosa	3,9	341	Negativo	0,95	119	179		1,0	0,9	a
2 Ácido quínico	4,4	191	Negativo	0,97	85	173		1,0	0,0	a
3 Isómero Bis-HHDP glucosa (pedunculagina I)	4,4	783	Negativo	-	301	275	481	1,0	0,1	b
4 Ácido digaloilquínico	4,6	495	Negativo	-	343	191	169	1,0	0,0	c
5 Isómero Bis-HHDP glucosa	4,8	783	Negativo	-	301	481		1,0	0,2	b
6 Derivado de ácido gálico	5,7	359	Negativo	-	169	313		0,0	1,0	c
7 Ácido gálico	5,9	169	Negativo	-	124			1,0	0,0	c
8 Derivado de ácido gálico	6,5	449	Negativo	-	271	124	210	1,0	0,0	c
9 Procianidina B2	7,1	579	Positivo	0,70	427	291	247	0,2	1,0	a
10 Derivado de ácido gálico	7,8	449	Negativo	-	271	169		1,0	0,0	a
11 Galocatequina	8,0	305	Negativo	0,96	169	261	165	0,3	1,0	a
12 Digaloilglucosa	10,6	483	Negativo	0,75	271	313	169	1,0	0,1	a
13 Epicatequina	10,9	291	Positivo	0,86	139	123	165	0,0	1,0	a
14 Catequina	13,8	289	Negativo	0,97	244	205	179	0,3	1,0	a
15 Miricetina 3-O-beta-D- galactosido 6"-O-galato	15,8	631	Negativo	0,71	479	317	299	0,6	1,0	a
16 Gosipetina	15,8	319	Positivo	0,75	273	245	301	1,0	0,5	a
17 Miricetina-3-O-pentósido	18,0	449	Negativo	0,75	316	317	169	0,3	1,0	a
18 Miricetina-3-O-hexósido	23,4	479	Negativo	0,93	316	317		0,6	1,0	a
19 Miricitrina	25,0	463	Negativo	0,87	317	316		0,3	1,0	a
20 Isoquercitrina	29,6	463	Negativo	0,73	301	316		0,3	1,0	a
21 Avicularina	32,2	433	Negativo	0,93	300	301	302	0,6	1,0	a
22 Hiperósido	33,3	465	Positivo	0,75	303	447		0,5	1,0	a
23 Ácido elágico	33,8	301	Negativo	-	301	256	228	1,0	0,0	c
24 Quercetina-3-O-pentósido	35,9	433	Negativo	0,89	300	301	271	0,6	1,0	a
25 Miricetina	35,7	317	Negativo	0,95	315	179	137	0,4	1,0	a

26	Quercetina-3-O-glucurónido	36,8	477	Negativo	0,85	301	302		0,2	1,0	a
27	Canferol	39,8	288	Positivo	0,75	241	165	213	0,4	1,0	a
28	Canferol-3-O-glucósido	39,9	447	Negativo	0,75	285	445		0,4	1,0	a
29	Quercitrina	40,4	447	Negativo	0,82	301	445	302	0,3	1,0	a
30	Canferol-7-O-ramnósido	43,1	431	Negativo	0,81	285	256		0,0	1,0	a
31	Isoramnetina-3-O-rutinósido	54,6	625	Positivo	0,75	479	481	315	0,0	1,0	
32	Hexósido de ácido madecásico	54,8	665	Negativo	-	503			1,0	0,0	c
33	Quercetina	58,4	301	Negativo	-	179	301	151	0,0	1,0	c
34	Ácido asiático	72,7	487	Negativo	-	409	421		0,2	1,0	c
35	Docosanol	75,8	325	Negativo	0,93	183	184	375	1,0	0,0	
36	Ácido madecásico	79,2	503	Negativo	-	437	389		1,0	0,0	c

t_r: tiempo de retención. **Cosine*: valor que representa la similitud espectral EM² entre moléculas estructuralmente relacionadas en la derreplicación de GNPS, un valor igual a 1 representa espectros idénticos y un puntaje de 0 no indica similitud alguna. ** La semiquantificación se realizó con respecto al extracto con el área más alta obtenida en el modo de ionización seleccionado en el análisis CL-EM.

a: Análisis obtenido por derreplicación en la plataforma GNPS (*High-Throughput Dereplication*)

b: Fischer et al./Food Chemistry 127 (2011) 807–821

c: Peña-Cerda et al./Food Chemistry 215 (2017) 219–227

Otro polifenol identificado principalmente en el EET corresponde al ácido elágico, el cual es un dímero de ácido gálico producido por oxidación (Pubmed Database) y corresponde al precursor de los taninos gálicos identificados en las hojas de murtilla ($t_r = 33,8$ min).

Respecto a los flavonoides identificados en ambos extractos, principalmente corresponden al grupo de los flavan-3-oles y flavonoles. Entre ellos, destacan la epicatequina ($t_r = 10,9$ min), catequina ($t_r = 13,8$ min), miricetina ($t_r = 37,9$ min), canferol ($t_r = 39,8$ min) y quercetina ($t_r = 58,4$). Además, se identificó gopipetina ($t_r = 15,8$ min), una hexahidroflavona, y procianidina B2, correspondiente a una proantocianidina conformada por dos moléculas de epicatequina unidas en las posiciones 4 y 8' en configuración beta (National Center for Biotechnology Information, 2020). La familia de flavan-3-oles y de flavonoles también se identificaron mediante la conformación de redes moleculares (**Figuras 23-B y 23-D**).

Por otro lado, en el grupo de los heterósidos flavónicos en ambos extractos se identificaron compuestos como miricetina 3-O-beta-D-galactosido''6"-O-galato ($t_r = 15,8$), miricetina-3-O-pentósido ($t_r = 18,0$ min), miricetina-3-O-hexósido ($t_r = 23,4$ min), miricitrina ($t_r = 25$ min), isoquercitrina ($t_r = 29,6$), avicularina ($t_r = 32,2$ min), hiperósido ($t_r = 33,3$), quercetina-3-O-pentósido ($t_r = 35,9$ min), quercetina-3-O-glucurónido ($t_r = 36,8$ min), canferol-3-O-glucósido ($t_r = 39,9$ min) y canferol-7-O-ramnósido ($t_r = 43,1$ min). En general, estos compuestos se encuentran en mayor cantidad en el EAE, lo que coincide con el valor obtenido en la cuantificación de flavonas y flavonoles. Además, la mayoría de los polifenoles identificados coinciden con lo reportado tanto para extractos polares de hojas de murtilla silvestre (Rubilaret al., 2006, Jara-Moreno et al., 2018) como para extractos de hojas obtenidas de distintos genotipos, incluido el G. ZF-18 (Peña-Cerda et al., 2017). Entre las moléculas no polifenólicas identificadas mediante CLAE-EM se encuentran: ácido madecásico, ácido asiático y un hexósido de ácido madecásico (saponina triterpénica).

Es importante destacar que gracias al estudio mediante derreplicación fue posible identificar moléculas que no se habían reportado anteriormente en los extractos polares de hojas de murtilla, como gopipetina, avicularina e hiperósido. En la **Figura 21** se muestra un ejemplo de

la identificación de catequina en el EAE G. ZF-18₂₀₁₅ mediante derreplicación por comparación con espectros de compuestos disponibles en las librerías de la plataforma GNPS.

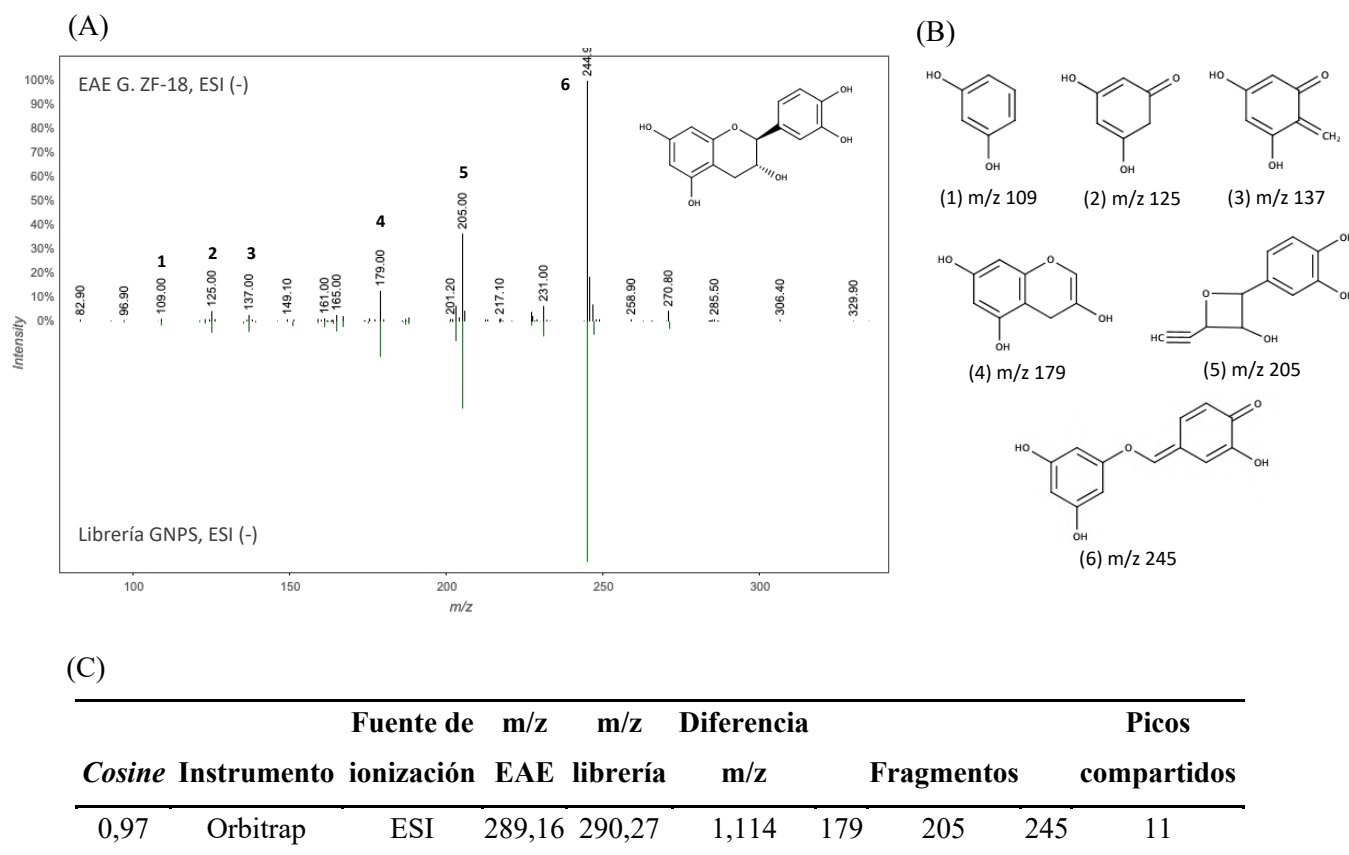
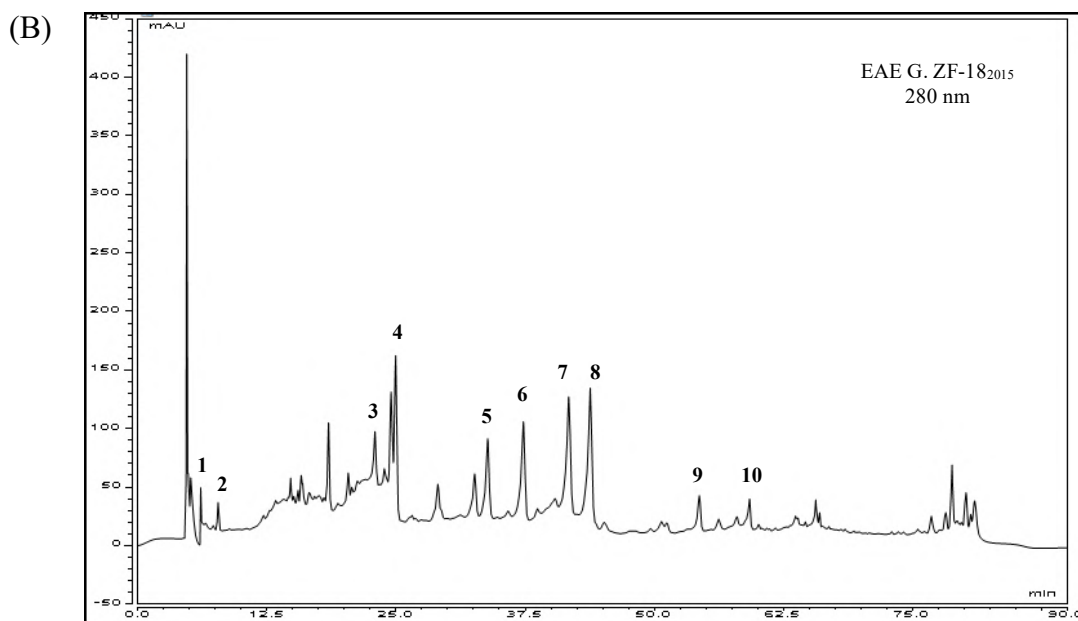
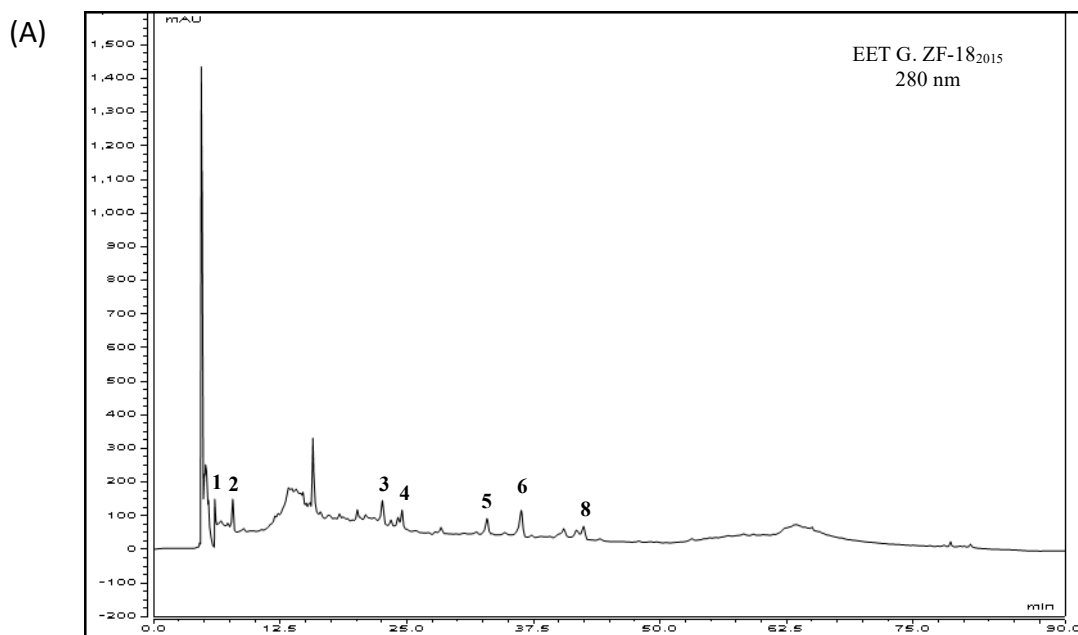


Figura 21. Ejemplo de derreplicación para la identificación de catequina. (A) Espectros de masas del EAE G.ZF-18₂₀₁₅ (parte superior) y espectro de catequina de la librería en la plataforma GNPS (parte inferior), (B) Estructura química de los principales fragmentos coincidentes entre ambos espectros EM/EM, (C) Información tabulada de los resultados de la derreplicación de catequina.

6.2.2.4.2. Perfil fenólico del EET y EAE G. ZF-18₂₀₁₅ determinado mediante CLAE-DAD

Los cromatogramas que se muestran en la **Figura 22** son similares tanto para el EET como para el EAE a ambas longitudes de onda (280 y 360 nm). La principal diferencia entre ambas muestras está relacionada a la intensidad de la absorbancia de los picos presentes en cada extracto, encontrándose una mayor concentración de los compuestos de mayor polaridad ($t_r < 10$

min) en el EET, los cuales se visualizan a una longitud de onda de 280 nm y estarían relacionados estructuralmente a ácidos fenólicos. En cambio, en el EAE se encuentran en mayor proporción los compuestos que se visualizan a 360 nm, entre los tiempos de retención de 35 a 65 min, asociados principalmente a flavonoides y sus heterósidos.



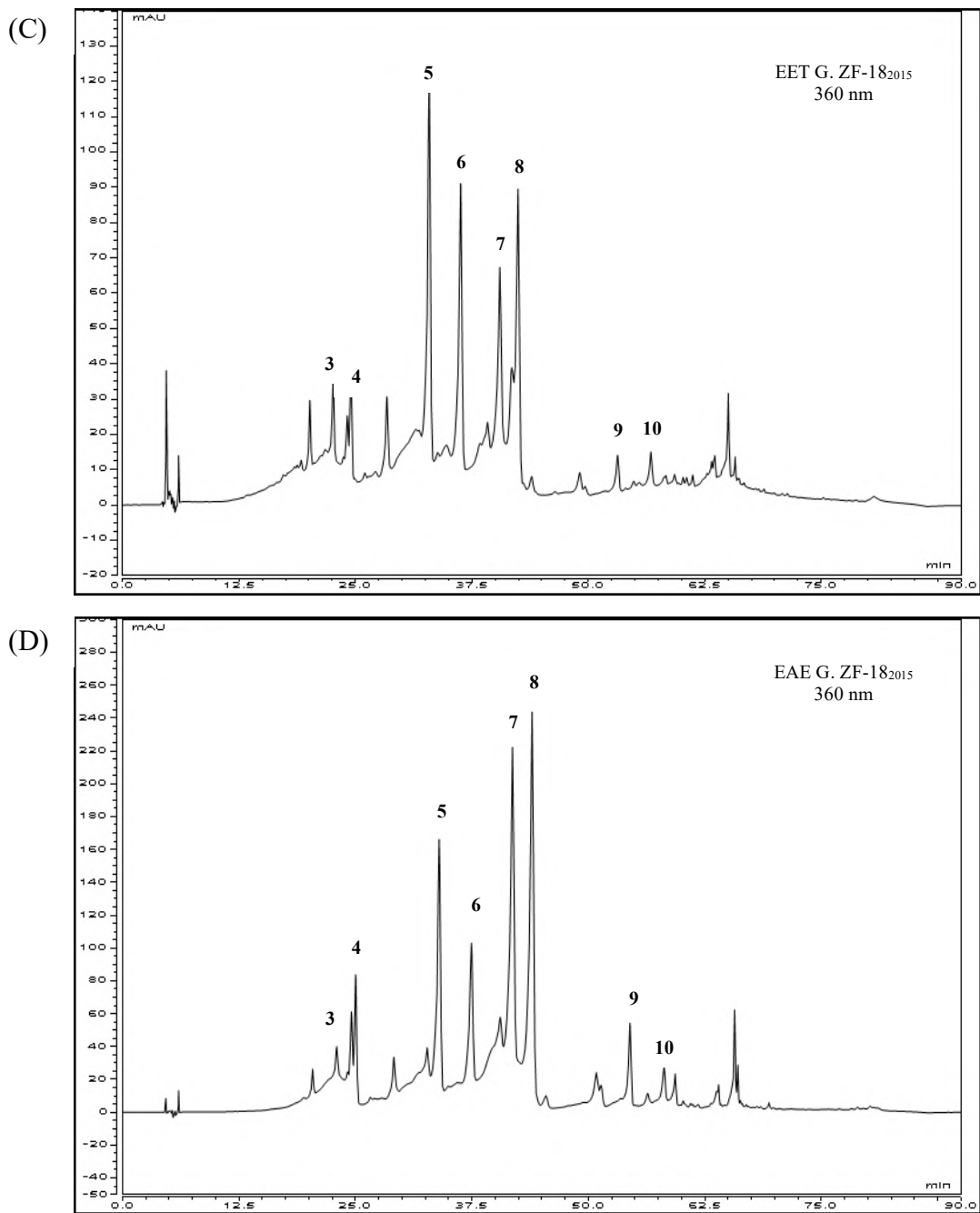


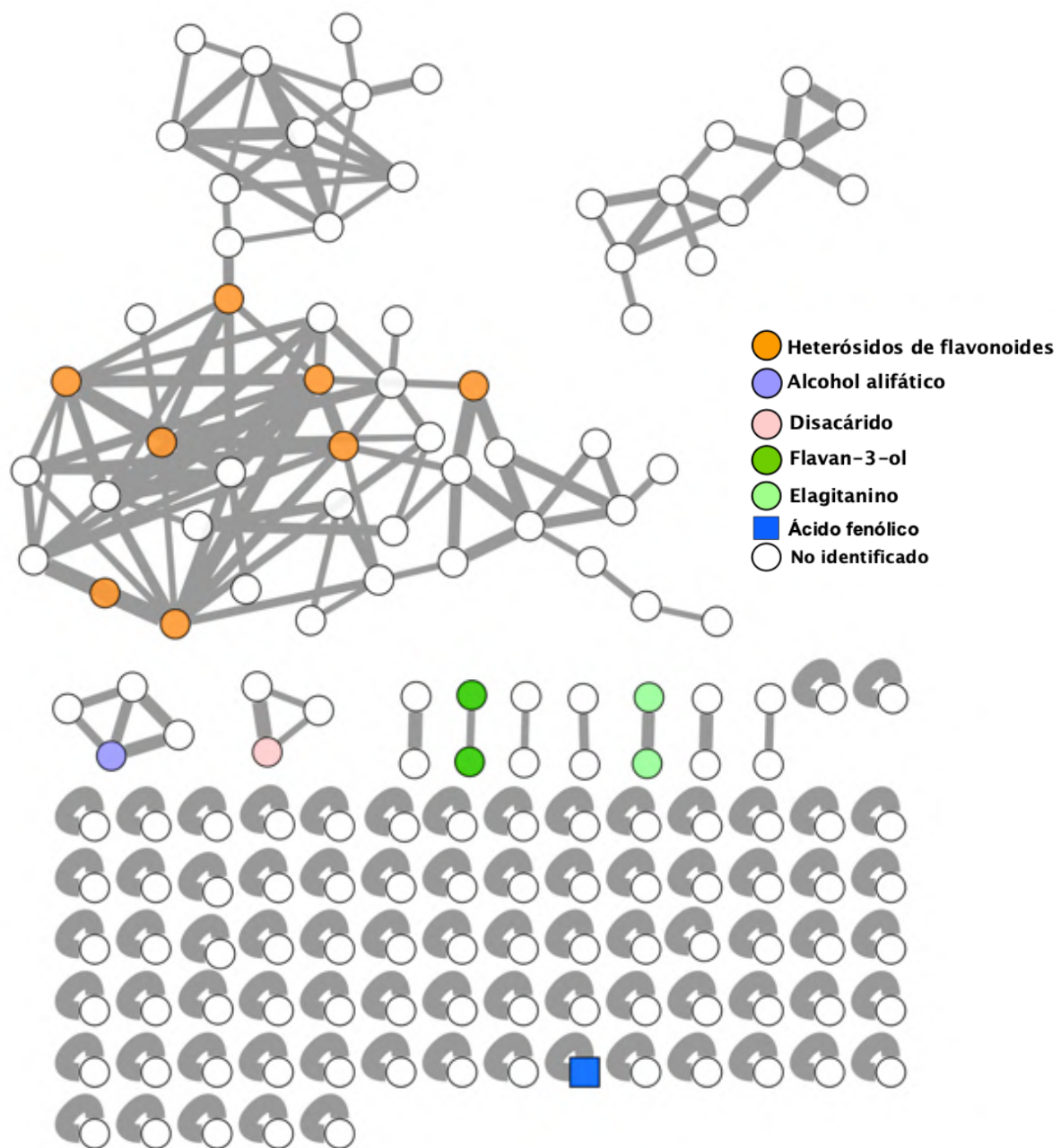
Figura 22. Cromatogramas del perfil fenólico del EET y EAE del G. ZF-18₂₀₁₅ obtenidos mediante CLAE-DAD. (A) EET y (B) EAE a 280 nm; (C) EET y (D) EAE a 360 nm. El análisis fue realizado a temperatura ambiente mediante la inyección de 20 μ L de blanco (metanol), usando un sistema de gradiente conformado por dos fases: (A) agua y ácido fórmico 0,1 % (98/2) y (B) agua, acetonitrilo y ácido fórmico 0,1 % (18/80/2). La velocidad de flujo fue de 0,6 mL/min y el gradiente de elución fue: 0–8 min 10% B, 8–45 min 16% B, 45–55 35% B, 55– 72 min 80% B, 72–75 min 100% B,

75–80 min 5% B and 80– 90 min 10% B. Algunos de los compuestos identificados tentativamente fueron: (1) ácido gálico, (2) derivado de ácido gálico, (3) miricetina-3-O-hexósido, (4) miricitrina, (5) avicularina, (6) miricetina, (7) canferol, (8) quercitrina, (9) isoramnetina-3-O-rutunósido y (10) quercetina.

6.2.2.4.3. Redes moleculares (*molecular networking*)

La formación de redes moleculares es una técnica que permite visualizar conjuntos de espectros EM/EM de moléculas relacionadas estructuralmente. Esto permite analizar distintos grupos entre sí para compararlos y determinar coincidencias o diferencias de su composición química, además de descubrir moléculas nuevas con mayor facilidad (Wang et al., 2016). En el caso del EET y EAE del G. ZF-18, las redes moleculares se formaron en la plataforma GNPS, donde se compararon los espectros de masas de ambos extractos, generando grupos o *clusters* de compuestos con semejanza estructural. Los compuestos que presentaban patrones similares de fragmentación entre ambos extractos, por lo tanto, se agruparon en nodos (representados en círculos) en cada cluster. Cabe destacar que este tipo de análisis permite agrupar compuestos similares estructuralmente a pesar de no haber identificado a qué compuesto en particular corresponde cada nodo (círculos en blanco).

(A)



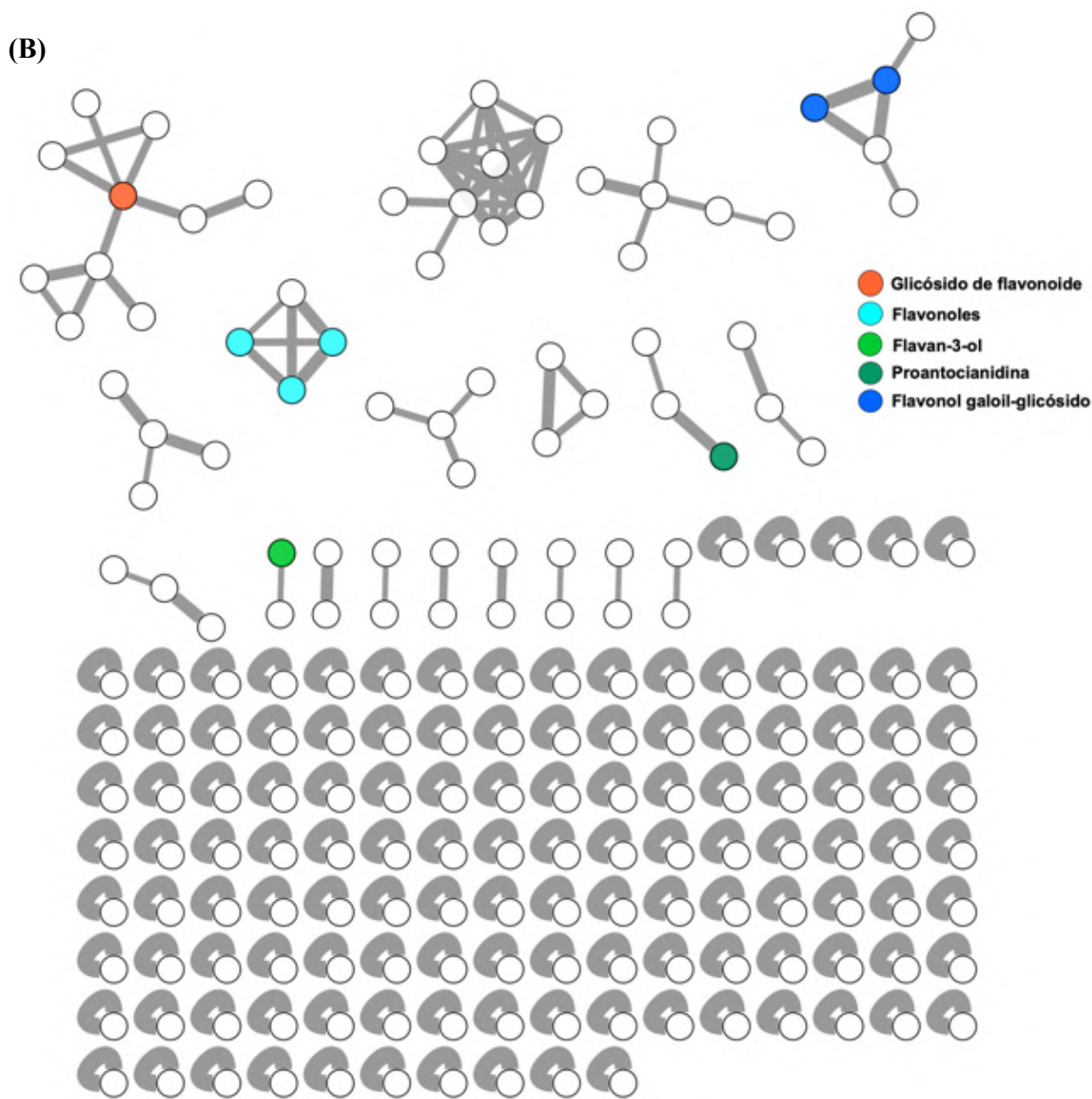
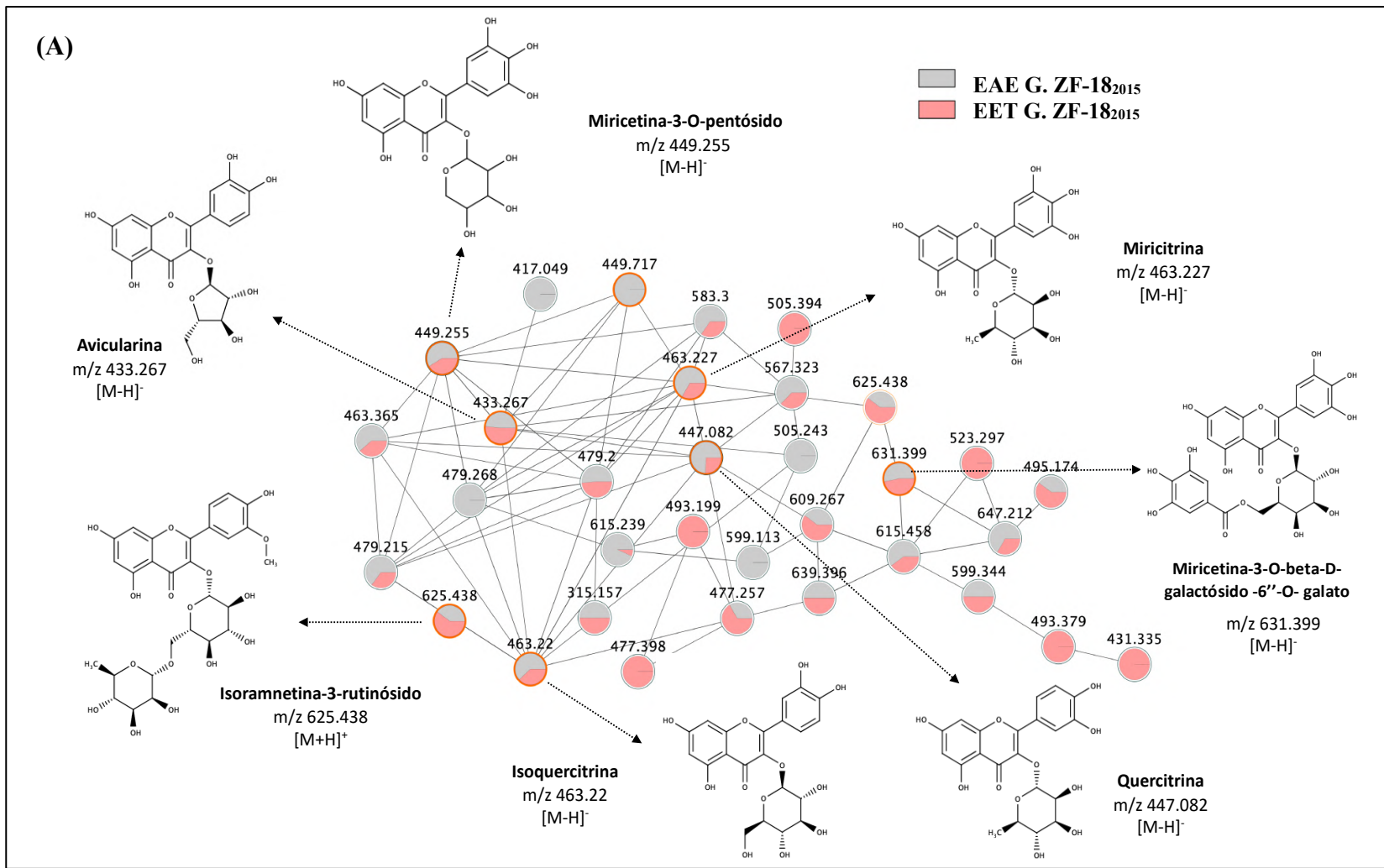


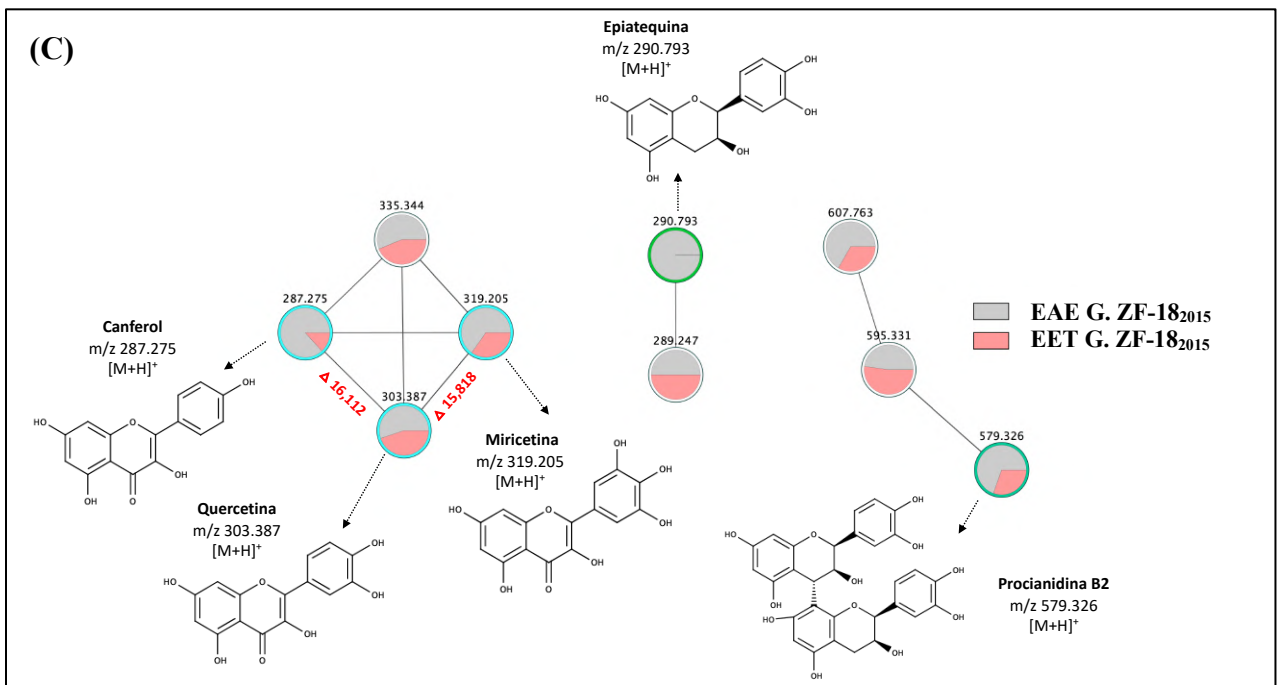
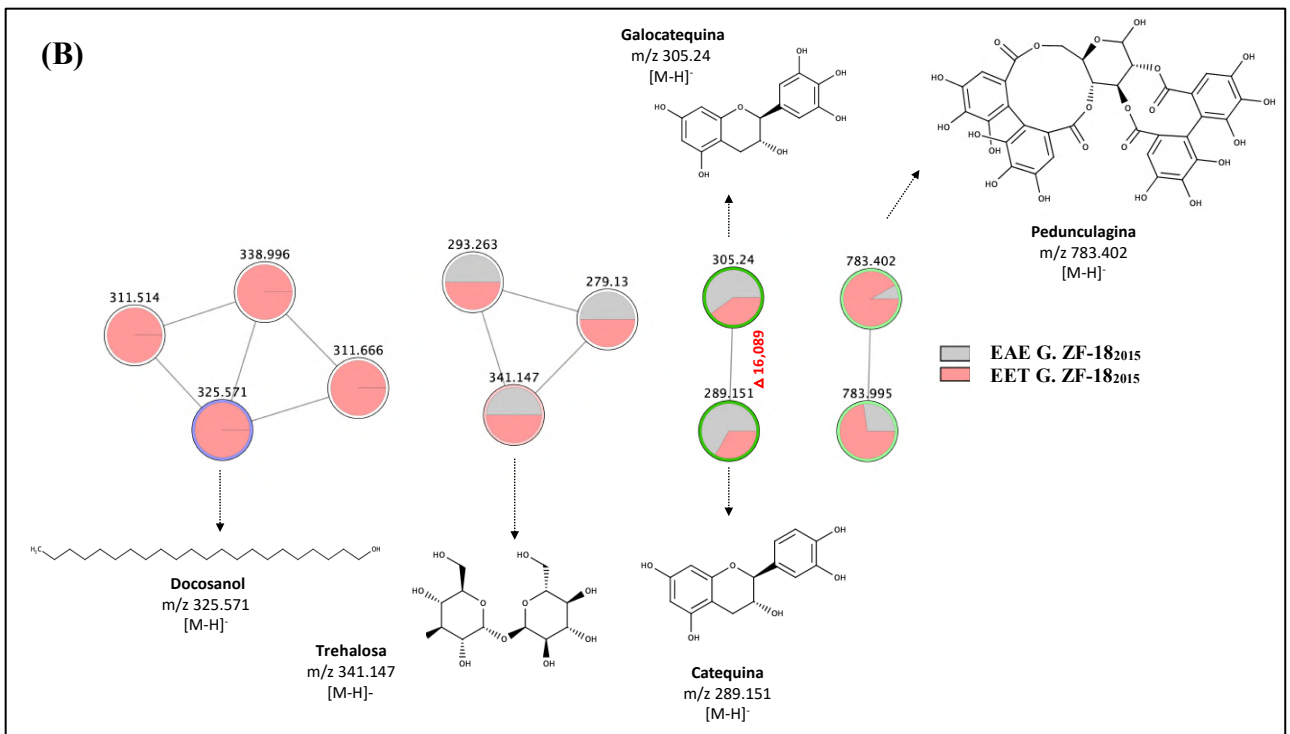
Figura 23. Redes moleculares del EAE y EET de las hojas de *U. molinae* del genotipo ZF-18₂₀₁₅ analizadas en la plataforma GNPS y visualizadas con el software Cytoscape 3.6.1. A) Familias de compuestos identificados principalmente en modo negativo y B) Familias de compuestos identificados principalmente en modo positivo. Cada color representa una familia diferente de compuestos y la visualización de redes moleculares representa cada espectro como un nodo (círculos) y las alineaciones de espectro a espectro como bordes (conexiones representadas por las líneas grises) entre nodos. La similitud del puntaje del coseno (*cosine score*) fue de 0,7 y este valor determina el grosor del borde entre los nodos relacionados (cuanto más grueso es el borde, mayor es el puntaje del coseno y, por lo tanto, más relacionados están los dos nodos individuales entre sí).

De acuerdo con los resultados obtenidos de las redes moleculares de la **Figura 23**, es posible distinguir distintas familias de compuestos relacionadas entre sí (espacio superior) y compuestos que no presentan relación estructural con otros (nodos únicos en la parte inferior). Por otro lado, estas familias de compuestos están presentes en ambos extractos y la principal diferencia es que los compuestos identificados se encuentran en distintas proporciones (**Figura 24**). Estos resultados corroboran de forma visual y esquemática lo que se había observado en el análisis anterior por derreplicación y en trabajos previos donde se ha analizado la composición química de EETs y EAEs de hojas de murtila (Peña-Cerda et al. 2017; Jara-Moreno et al., 2018).

En modo de ionización negativo se detectaron 11 familias de compuestos y en modo de ionización positivo 19, sin embargo, no todos los compuestos pertenecientes a esas familias se lograron identificar mediante la plataforma GNPS. Algunos de estos compuestos se relacionan estructuralmente, pero no se encontraron coincidencias con las librerías disponibles en la plataforma.

A continuación se presentan las familias de compuestos más representativas de cada mapa de redes moleculares, destacando algunas moléculas que no habían sido identificadas hasta el momento en las hojas de murtila (**Figura 24**).





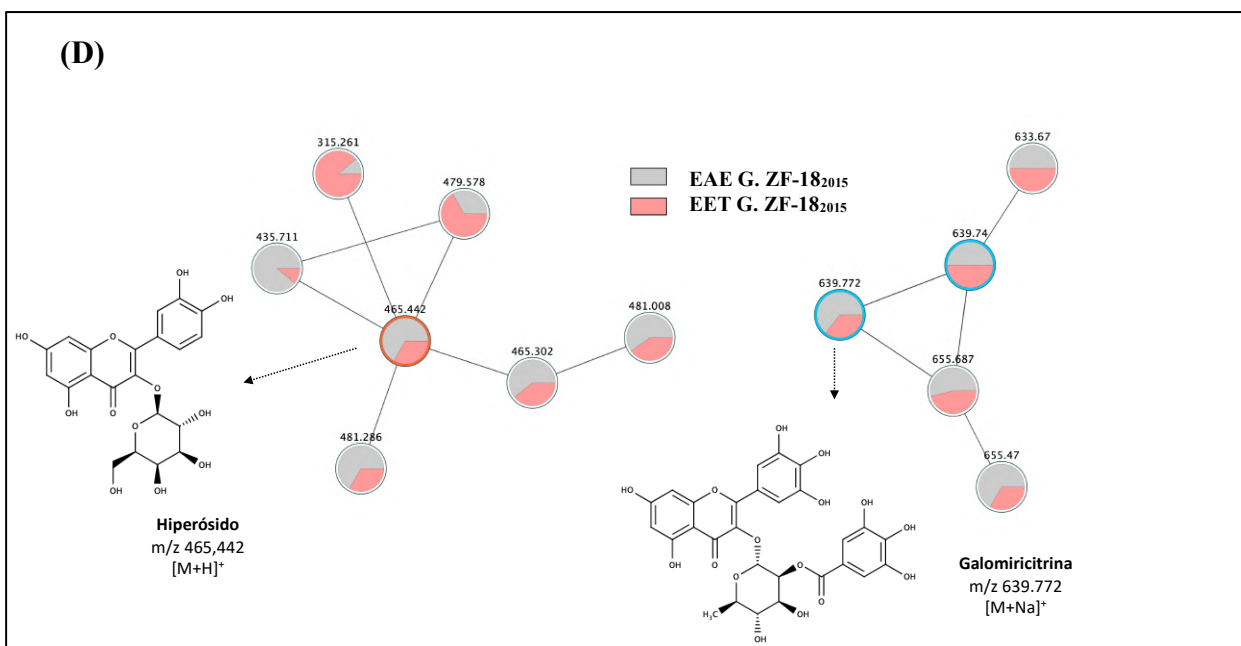


Figura 24. Redes moleculares de las principales familias de compuestos presentes en EAE y EET de las hojas de *U. molinae* del G. ZF-18₂₀₁₅. (A) Grupo (*cluster*) de glucósidos flavonoides, (B) Grupos de alcohol alifático, disacárido, flavan-3-ol y taninos hidrolizables, (C) Grupos de flavonoles, flavan-3-ol y proantocianidina, (D) Grupos de glucósidos de flavonol. Cada nodo contiene un gráfico circular con la proporción de los compuestos presentes en cada extracto y la m/z del ion precursor. El símbolo delta corresponde a la diferencia en peso molecular (Da) entre dos nodos.

Las redes moleculares obtenidas para el EAE y EET de las hojas del G. ZF-18₂₀₁₅ facilitó la comparación de las principales moléculas presentes en ambos extractos mediante la formación de familias de compuestos relacionados estructuralmente entre sí (nodos). La familia de compuestos más grande correspondió a heterósidos flavónicos (**Figura 24-A**), donde destacan heterósidos de flavonoles como quercitrina (m/z 447), isoquercitrina (m/z 463), miricitrina (m/z 463), miricetina-3-O-pentósido (m/z 449), isoramnetina-3-O-rutinósido (m/z 625), avicularina (m/z 433) y miricetina-3-O-beta-D-galactosido-6"-O-galato. La mayor parte de compuestos coinciden con los heterósidos identificados en otras investigaciones de extractos acuosos de hojas de murtilla (Avello et al., 2013), así como en los EETs y EAES de hojas de murtilla silvestre (Jara-Moreno et al., 2018) y de distintos genotipos (Peña-Cerda et al., 2017). Sin embargo, es primera vez que se reporta tentativamente la presencia de isoramnetina-3-O-

rutinósido y avicularina, esta última correspondiente a un derivado arabinofuranósido de quercetina que se ha aislado e identificado en las hojas de *Myrcia tomentosa* (Myrtaceae), un arbusto perteneciente a la misma familia de la murtila (Imatomiet al., 2013).

Otros de los compuestos que no se encontraban identificados en las hojas de murtila corresponden a docosanol y trehalosa (**Figura 24-B**). El primero corresponde un alcohol alifático ($C_{22}H_{46}O$) que probablemente forma parte de la composición química de las ceras que se encuentran en la cutícula de las hojas de murtila. La cutícula es una capa continua lipídica extracelular sintetizada por las células epidérmicas y cuya función es proteger del medio externo a las partes aéreas de plantas superiores (Tafolla-Arellano et al., 2013). Cabe destacar que este alcohol graso fue identificado solamente en el EET y no se encontró su presencia en el EAE del G. ZF-18₂₀₁₅.

Por otro lado, la trehalosa corresponde a un disacárido no reductor en el que dos moléculas de glucosa están unidas por un enlace glicosídico. En un inicio se pensaba que este disacárido se encontraba presente solamente en microorganismos y en algunas plantas resistentes a sequías, conocidas como “platas de resurrección”. Sin embargo, desde hace aproximadamente 20 años se ha estudiado su ruta biosintética y se ha encontrado su presencia en otras plantas superiores, relacionándola con un posible efecto protector debido a la acumulación de este compuesto en plantas sometidas a condiciones de estrés (Fernández et al., 2010).

Respecto a los flavonoles, se identificó una familia compuesta por quercetina, miricetina y canferol (**Figura 24-C**). Estos flavonoles se han identificado previamente en diversos estudios con extractos polares de hojas de murtila (Rubilar et al., 2006; Jara-Moreno et al., 2018 y Peña-Cerda et al., 2017) y como se observa en los gráficos de torta de cada nodo, estos se concentran principalmente en el EAE. Estos flavonoles corresponden a las agliconas de los heterósidos de la **Figura 24-A** y es común encontrarlos en las hojas de *Camellia sinensis*, asociándolos al efecto antioxidante de sus infusiones (Jeganathan et al., 2016). También es posible visualizar un cluster de moléculas no identificadas en la parte superior derecha de la **Figura 23-A**, el cual podría corresponder a una familia de flavonoles debido a que los compuestos de los nodos que lo conforman presentan m/z entre 300 y 445 Da.

Finalmente, se identificó un aducto sódico (m/z 639) correspondiente a la miricitrina unida a una molécula de ácido gálico (**Figura 24-D**). Este heterósido tiene un peso molecular de 616,5 Da y de acuerdo con el espectro EM/EM, el fragmento más abundante es un ion de m/z de 317 que correspondería a la aglicona miricitrina. Varios de los compuestos identificados en las hojas del G. ZF-18₂₀₁₅ coinciden con polifenoles aislados de hojas de *Myrtus communis*, un arbusto perteneciente a la familia de las mirtáceas y en el cual se identificaron distintos glicósidos de miricetina, ácido quínico, ácido gálico y distintos taninos hidrolizables (Yoshimura et al., 2010).

6.3. ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE *IN VITRO* DEL EET y EAE del G. ZF-18₂₀₁₅

La actividad antioxidante del EET y EAE del G. ZF-18₂₀₁₅ fue evaluada mediante dos metodologías *in vitro* con el fin de comparar los resultados entre ambos extractos y con los resultados obtenidos en los extractos del G. ZF-18 del año 2013.

6.3.1. Ferric reducing antioxidant power (FRAP)

El método FRAP evalúa la capacidad de los extractos de reducir un complejo TPTZ-Fe³⁺ a TPTZ-Fe²⁺. En la **Figura 25** se presentan los resultados obtenidos por el EET y EAE del G. ZF-18 de los años 2013 y 2015. Como se había determinado en estudios previos (Peña-Cerda, 2016) el valor FRAP va aumentando a medida que transcurre el tiempo, por lo que se realizaron mediciones a tiempos tempranos (4 min), a los 30 y a los 60 min. Los resultados de las absorbancias a los distintos tiempos se interpolaron en una curva de calibración con FeSO₄ ($Y = 0.0178X - 0.0034$, $R = 0.998$, *run test* $p < 0,05$). Los EETs no presentaron diferencias significativas en su valor FRAP a los distintos tiempos evaluados, lo que se correlaciona con lo observado en el resultado del CFT y el CTT, donde no se encontraron diferencias significativas en los valores de ambos extractos. Sin embargo, la reducción del complejo TPTZ-Fe³⁺ por parte del EAE del G. ZF-18₂₀₁₅ fue mayor, lo que podría estar relacionado a la mayor cantidad de flavonoles presentes en este extracto en comparación a los flavonoles cuantificados en el EAE₂₀₁₃ mediante el ensayo colorimétrico con AlCl₃. Sin embargo, a pesar de que los valores FRAP aumentaron para el EAE₂₀₁₅, fueron menores que los valores obtenidos por el EET₂₀₁₃.

Esta tendencia se comprobó en el estudio de la capacidad antioxidante de los 10 genotipos de murtila que se han estudiado en nuestro laboratorio, donde todos los EETs analizados exhibieron mejores resultados que los EAEs.

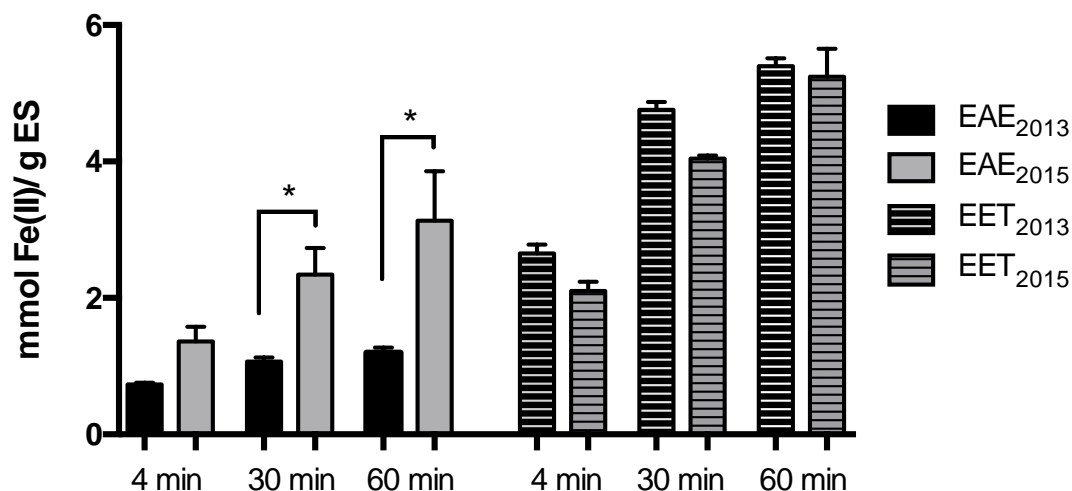


Figura 25. Valores FRAP de los EETs y EAEs de las hojas de murtila del G. ZF-18₂₀₁₃ y G. ZF-18₂₀₁₅. Los valores FRAP se expresan como mmol Fe²⁺/g extracto seco (ES) y el análisis estadístico se realizó mediante ANOVA de una vía, seguido por el test de comparaciones múltiples de Tukey, *p<0,05.

Por otro lado, el valor FRAP a los 60 min de ambos EETs fue similar al patrón de TROLOX (7,5 ± 0,20 mmol Fe²⁺/g TROLOX) pero es mucho más bajo que un estándar de quercetina (31,5 ± 0,24 mmol Fe²⁺/g quercetina) (Peña-Cerda et al., 2017). El menor valor FRAP obtenido por los extractos, en comparación al valor FRAP de un flavonol aislado como quercetina, se podría explicar debido a la mezcla de compuestos fenólicos presente en ellos. Se ha determinado que la interacción entre flavonoles como quercetina, canferol y miricetina mediante puentes de hidrógeno, podría disminuir la actividad antioxidante de estos compuestos en comparación a la actividad que presentan al evaluarlos aislados (Hidalgo et al., 2010). Este fenómeno podría estar ocurriendo en los extractos ya que mediante el estudio de derrepiación realizado, se determinó que una de las familias de compuestos fenólicos presente en ambos extractos del año 2015, principalmente en el EAE, correspondía a este tipo de flavonoles.

6.3.2. Apagamiento del radical 2,2-difenil-1-picrilhidrazilo (DPPH)

El ensayo de apagamiento del radical DPPH es ampliamente utilizado para evaluar la actividad antioxidante *in vitro* de extractos de distintas especies vegetales y también de alimentos. Al mezclar la solución de DPPH con una molécula que pueda donar un átomo de hidrógeno, se da lugar a la forma reducida del radical con la pérdida del color violeta y cuya decoloración tiene una relación estequiométrica con el átomo de hidrógeno cedido por los compuestos fenólicos (Kedare y Singh, 2011). Las curvas de decaimiento de cada extracto se encuentran en el ANEXO 6 y los valores de CE_{50} se obtuvieron de los gráficos de DPPH remanente (%) v/c concentración (Figura 26)

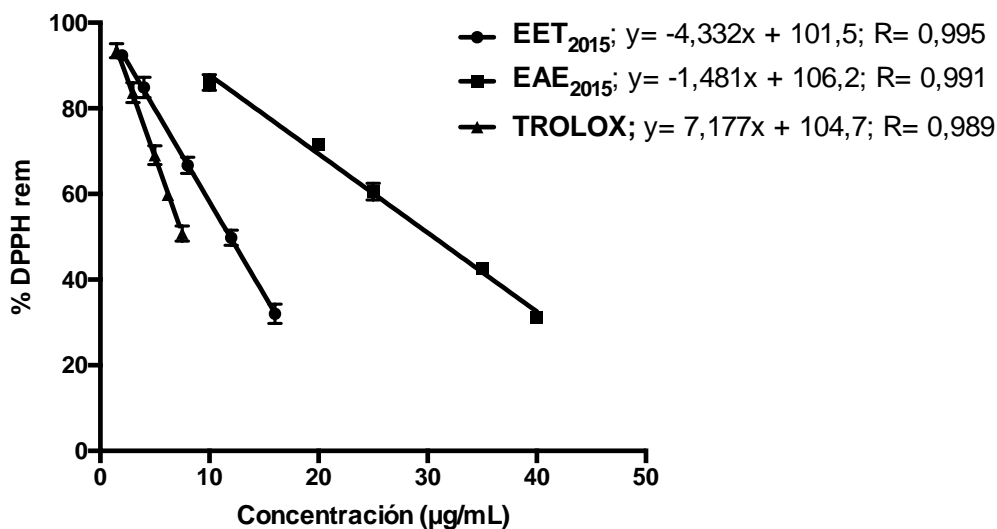


Figura 26. DPPH remanente (%) luego de 90 min de reacción con el EET y el EAE del G. ZF-18₂₀₁₅ y el compuesto de referencia (TROLOX) a distintas concentraciones. Las curvas se analizaron en el programa GraphPad prism mediante el *Run Test* de regresión lineal, determinando que las curvas no difieren significativamente de una línea recta ($n=3$, $p>0,05$). A partir de estas curvas se determinó la CE_{50} de los EAE y EET del G. ZF-18₂₀₁₅.



Figura 27. (A) Concentración efectiva 50 (CE₅₀) del EET y EAE del G. ZF-18₂₀₁₅. (B) Tabla comparativa de los valores de CE₅₀ de los EETs y EAES de las hojas del G. ZF-18₂₀₁₃ y G. ZF-18₂₀₁₅. ^{a, b, c} Letras diferentes representan diferencias significativas ($p < 0,001$) respecto al resto de las muestras, calculado con ANOVA de una vía y el test de comparaciones múltiples de Tukey. Los resultados se muestran como el promedio ($n=3$) \pm DE. (B) Tabla con los valores de CE₅₀ \pm DE presentado por los extractos de hojas recolectadas en el año 2015 y el año 2013. *datos obtenidos de la tesis de Peña-Cerda (2016).

De acuerdo con los resultados para los extractos del G. ZF-18₂₀₁₅ (**Figura 27**), la CE₅₀ del EET fue menor a la obtenida por el EAE, por lo que la potencia antioxidante de este extracto evaluada mediante el apagamiento del radical DPPH, es alrededor de tres veces mayor que la del EAE. Las tendencias de estos valores son similares a las obtenidas por los extractos de las hojas del mismo genotipo del año 2013 y nuevamente los extractos fueron menos potentes que el compuesto de referencia TROLOX.

Las diferencias en la CE₅₀ de ambos extractos puede ser explicada debido a sus diferencias en la composición química analizada mediante el análisis de los espectros EM/EM, donde se determinó que los polifenoles de tipo elagitaninos, galotaninos, derivados de ácido gálico y de ácido quínico se encuentran presentes principalmente en el EET y los flavonoles y heterósidos flavónicos en el EAE. Se ha determinado que dependiendo de la estructura del polifenol y de las sustituciones que posea, el efecto antioxidante evaluado mediante la metodología del radical

DPPH puede variar significativamente. De acuerdo al estudio de Yokozawa T. et al. (1998), se concluyó que los grupos hidroxilo en posición orto son la característica estructural más importante para el efecto inhibitorio de radicales libres de taninos y flavonoides y que la actividad de los taninos incrementa al aumentar el peso molecular y los grupos galilo, pudiendo disminuir al sustituirlos por HHDP, probablemente por una disminución de los hidroxilos disponibles. Por otro lado, la glicosilación y metilación de flavonoles, principalmente en posición 3 del esqueleto, puede disminuir considerablemente la actividad antioxidante en comparación a la genina. De acuerdo a este estudio de Yokosawa, por lo tanto, los compuestos presentes en mayor proporción en el EET como el elagitanino pedunculagina ($CE_{50} = 2,50 \pm 0,07 \mu\text{M}$), el galotanino digaloilglucosa ($CE_{50} = 4,06 \pm 0,13 \mu\text{M}$) y derivados de ácido quínico como el ácido digaloil quínico ($CE_{50} = 4,14 \pm 0,08 \mu\text{M}$) tendrían una mayor actividad antioxidante frente al radical DPPH que los compuestos mayoritarios del EAE, entre los que se encuentran principalmente heterósidos como quercitrina ($CE_{50} = 11,3 \pm 0,58 \mu\text{M}$), miricitrina ($CE_{50} = 12,74 \pm 0,42 \mu\text{M}$), isoquercitrina ($CE_{50} = 13,28 \pm 0,79 \mu\text{M}$) y canferol ($CE_{50} = 22,81 \pm 1,47 \mu\text{M}$).

6.3.3. Resumen de la composición química y de la actividad antioxidante de los EETs y EAEs obtenidos de las hojas del genotipo 19-2 y del G. ZF-18₂₀₁₃ y G. ZF-18₂₀₁₅

Como se mencionó en el punto 6.3.1, los extractos seleccionados para conformar los grupos 1 y 2 diferenciados por su composición de polifenoles y por su composición de TPCs, respectivamente, corresponden a los EETs y EAEs de los genotipos 19-2 y ZF-18. Debido a que los extractos del G. ZF-18 de las hojas recolectadas en el año 2013 no eran suficientes para llevar a cabo los estudios celulares, se debió realizar una nueva extracción seriada con hojas de otro año de recolección (2015). A continuación, se presenta un resumen comparativo de los principales resultados del análisis químico obtenido por los EETs y EAEs del G. ZF-18₂₀₁₃, G. ZF-18₂₀₁₅ y del G. 19-2.

Como se observa en la **Tabla 12**, existen algunas diferencias en la composición química entre los extractos del G. ZF-18 de ambos años de recolección, sin embargo, el EET y el EAE del G.

ZF-18₂₀₁₅ nuevamente se caracterizaron por poseer una alta cantidad de polifenoles, principalmente de taninos. Por otro lado, también se observan diferencias en el contenido de TPCs, donde el EAE G. ZF-18₂₀₁₅ obtuvo una mayor cantidad de ácido madecásico, incluso mayor a la obtenida por el EAE G. 19-2. Este último extracto, sin embargo, se caracterizó por presentar una mayor concentración de ácido asiático, ácido corosólico y las mezclas de los ácidos ursólico y oleanólico.

De acuerdo a lo anterior, por lo tanto, se concluye que el EET y EAE del G. ZF-18₂₀₁₅, al igual que el G. ZF-18₂₀₁₃ anterior, presenta diferencias significativas respecto a los resultados del G. 19-2, por lo que los nuevos extractos obtenidos de las hojas del G. ZF-18₂₀₁₅ cumplieron los requisitos para conformar los grupos 1 y 2.

Los EETs y EAES de los genotipos 19-2 y ZF-18₂₀₁₅, por lo tanto, fueron los extractos que se utilizaron en los ensayos celulares para evaluar su efecto sobre funciones de fibroblastos dérmicos humanos asociadas a cicatrización.

Tabla 12. Resumen comparativo del análisis químico y de la actividad antioxidante de los EETs y EAEs de los genotipos ZF-18₂₀₁₃, ZF-18₂₀₁₅ y 19-2

Composición química		Extractos utilizados para los ensayos celulares					
		G. ZF-18 ₂₀₁₃		G. ZF-18 ₂₀₁₅		G. 19-2 ¹	
		EET	EAE	EET (grupo 1)	EAE (grupo 2)	EET (grupo 1)	EAE (grupo 2)
Polifenoles	CFT	261,8 ± 2,6^a	104,5 ± 1,3 ^c	222,1 ± 2,2^b	118,47 ± 1,5 ^c	162,6 ± 1,0 ^d	39,0 ± 0,3 ^e
	CTT	201,0 ± 1,6^a	33,6 ± 0,8 ^b	192,4 ± 1,2^a	26,7 ± 2,0 ^b	87,7 ± 0,6 ^c	5,6 ± 0,6 ^d
	CFF	34,5 ± 0,5	33,7 ± 0,5	20,3 ± 0,3	67,1 ± 1,7	34,5 ± 0,5	23,3 ± 0,9
TPCs²	Ácido madecásico	N.D	0,4 ± 0,0 ^a	N.D	1,71 ± 0,12^b	0,7 ± 0,0 ^c	0,9 ± 0,2 ^c
	Ácido asiático	3,3 ± 0,0 ^a	6,2 ± 0,3 ^b	0,1 ± 0,0 ^c	8,4 ± 0,1^d	4,4 ± 1,4 ^e	9,7 ± 2,0^f
	Ácido alfitólico*	N.D	4,0 ± 0,1	N.D	N.D	N.D	N.D
	Ácido corosólico**	1,7 ± 0,0	11,8 ± 0,6	0,25 ± 0,0	6,98 ± 0,5	N.D	12,0 ± 3,0
	Ácido maslínico	4,1 ± 0,1	11,6 ± 0,8	N.D	17,24 ± 2,4	5,9 ± 1,3	14,6 ± 3,6
	Ácidos ursólico/oleanólico	N.D	18,3 ± 1,0	N.D	2,20 ± 0,1	N.D	18,4 ± 0,7
Actividad Antioxidante	FRAP (60 min)	5,4 ± 0,1	2,0 ± 0,1	5,2 ± 0,4	3,1 ± 0,7	4,0 ± 0,3	1,2 ± 0,1
	DPPH CE₅₀	9,3 ± 0,6	37,1 ± 1,7	11,9 ± 0,3	30,5 ± 0,3	12,3 ± 0,6	66, 5 ± 4,4

Cada valor corresponde al promedio de la concentración obtenida de tres determinaciones para el CFT, CTT, CFF, FRAP y DPPH y de nueve determinaciones para el contenido de triterpenos pentacíclicos. Los valores más altos se destacan en formato negrita. CFT: Contenido Fenólico Total expresado en mg Eq ácido gálico/g ES. CTT: Contenido de taninos totales expresado en mg eq ácido tánico/ g ES. CFF: Contenido de flavonas y flavonoles expresado en mg eq quercetina/g ES. El contenido de TPCs se expresó como g de triterpeno/100g de extracto seco ± DE. *concentración expresada en ácido betulínico; ** concentración expresada en ácido ursólico. ND: no detectable; Valores FRAP expresamos en mmol Fe+2/ g ES. CE50 expresada en ug/mL. Misma letra (a, b, c, d) en cada fila representa valores que no son diferentes estadísticamente (p>0,05) determinado mediante ANOVA de una vía y test de comparaciones multiples de Tukey. ¹ Datos obtenidos de la tesis doctoral de Peña-Cerda (2017) y algunos valores del contenido de TPCs² de Arancibia-Radich et al. (2016)

6.4. EFECTO DE LOS EETs y EAES DE LOS GENOTIPOS 19-2 y ZF-18₂₀₁₅ SOBRE FUNCIONES DE FIBROBLASTOS DÉRMICOS HUMANOS ASOCIADAS A CICATRIZACIÓN

Con los EETs y EAES de los genotipos 19-2 y ZF-18₂₀₁₅ seleccionados por presentar diferencias en su composición química, se realizaron diversos ensayos *in vitro* para evaluar comparativamente su efecto sobre distintas funciones de fibroblastos dérmicos humanos. Estas células cumplen un importante rol dentro del proceso de cicatrización, principalmente en la fase proliferativa y de remodelación del tejido dañado mediante la síntesis de proteínas de la MEC, entre las cuales se encuentran colágeno tipo I, tipo III, fibronectina y glicosaminoglicanos (GAGs). Últimamente, además, se les ha atribuido una función moduladora de la actividad de otras células dérmicas que participan en la cicatrización cutánea, como queratinocitos y macrófagos, a través de la secreción de mediadores celulares durante la fase inflamatoria y proliferativa (Stunova y Vistejnova, 2018)

6.4.1. Solubilidad de los extractos seleccionados en medio acuoso

Antes de comenzar con el estudio *in vitro* en FDHs, se realizó una prueba de solubilidad de los extractos seleccionados con el objetivo de determinar las concentraciones en las cuales no se formara un precipitado en medio acuoso y así seleccionar concentraciones en las que los EETs y EAES se encontraran completamente solubles. Se evaluaron concentraciones entre 1-300 µg/mL en una solución de DMSO al 1% v/v en agua, las cuales corresponden a las condiciones en las que se realizaron los ensayos celulares. De acuerdo con la **Figura 28**, se observa que a concentraciones altas de los extractos la absorbancia aumenta de manera significativa, saliendo del rango de medición del equipo a 300 µg/mL. Al realizar una curva de Absorbancia v/s Concentración (**ANEXO 7**), se observó una pérdida de la linealidad a concentraciones mayores de 80-100 µg/mL para los EAES y mayores a 100 µg/mL para los EETs, lo que se correlacionó con la formación de precipitados.

De acuerdo con los resultados de la prueba de solubilidad, se seleccionaron concentraciones entre 0,1-80 µg/mL para los EAES y entre 0,1-100 µg/mL para los EETs, las cuales se utilizaron para realizar los ensayos de viabilidad celular en FDHs.

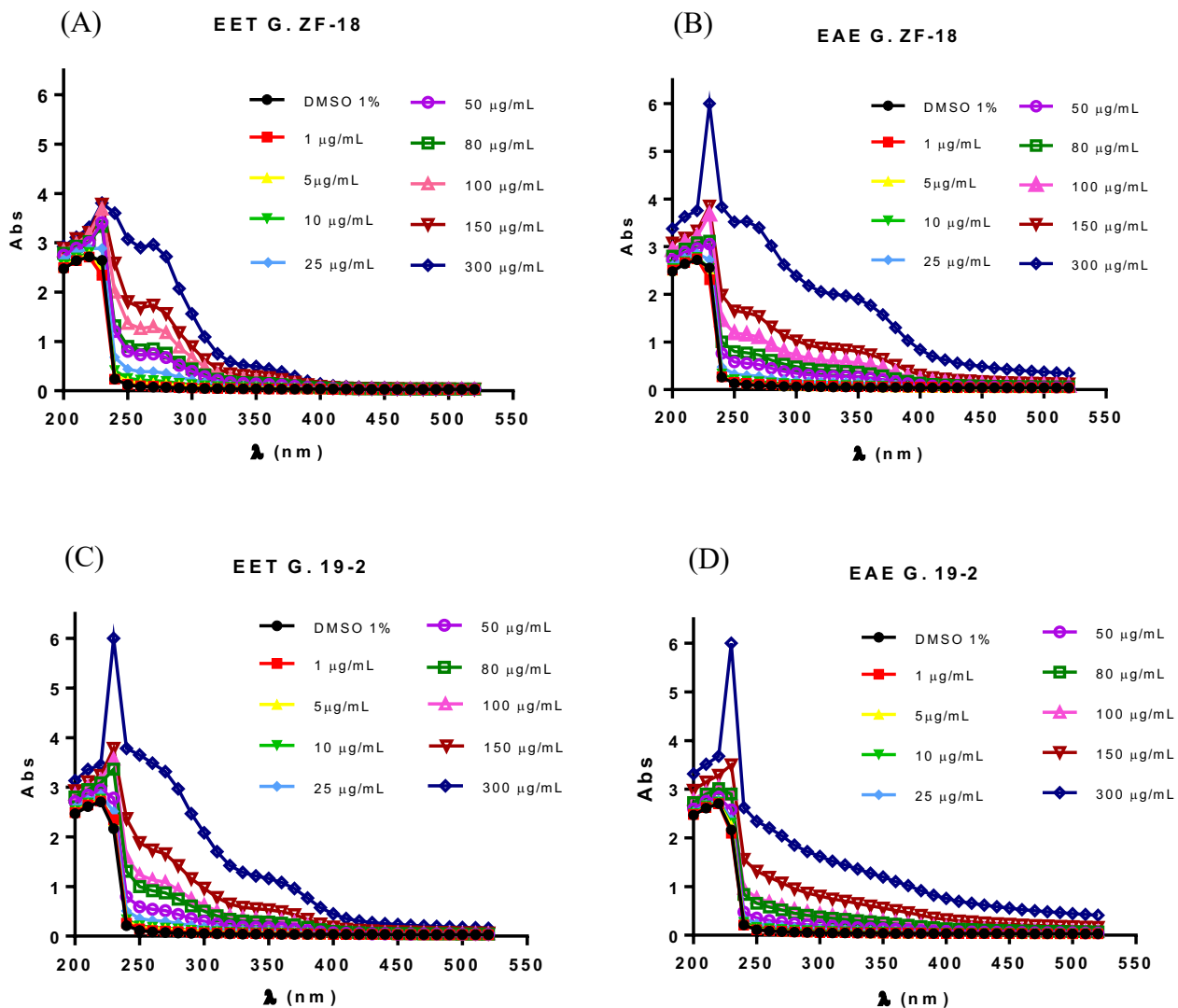


Figura 28. Prueba de solubilidad de los EETs y EAEs de los genotipos 19-2 y ZF-18₂₀₁₅. Absorbancias entre 200 y 520 nm del A) EET G. ZF-18₂₀₁₅, B) EAE G. ZF-18₂₀₁₅, C) EET 19-2 y D) EAE 19-2 a distintas concentraciones en DMSO al 1% v/v.

6.4.2. Aislamiento de fibroblastos dérmicos humanos (FDHs) a partir de cultivo primario

Las células se obtuvieron mediante explante y digestión enzimática a partir de muestras de piel de pacientes sometidos a cirugía plástica. Ambas metodologías dieron buenos resultados ya que se lograron obtener placas de cultivo (p100) confluentes luego de tres semanas aproximadamente. En relación al proceso de digestión enzimática, la principal diferencia frente al protocolo implementado en el laboratorio de Farmacología Molecular para obtener fibroblastos de corazón de ratas adultas, fue que en la última etapa de la digestión se realizó solamente una centrifugación para descartar el tejido no digerido, sin la obtención de pellet. En contraposición, se sembró el tejido digerido que quedaba en el sobrenadante y se esperó que los fibroblastos comenzaran a adherirse a la matriz plástica de la placa cultivo, logrando en alrededor de dos semanas un 90% de confluencia. Mediante la metodología de explante, por su parte, las células comenzaron a migrar desde el tejido entre los días 7 y 14 post-explante, tardando alrededor de un mes en llegar a confluencia, tal como se muestra en la **Figura 29**.

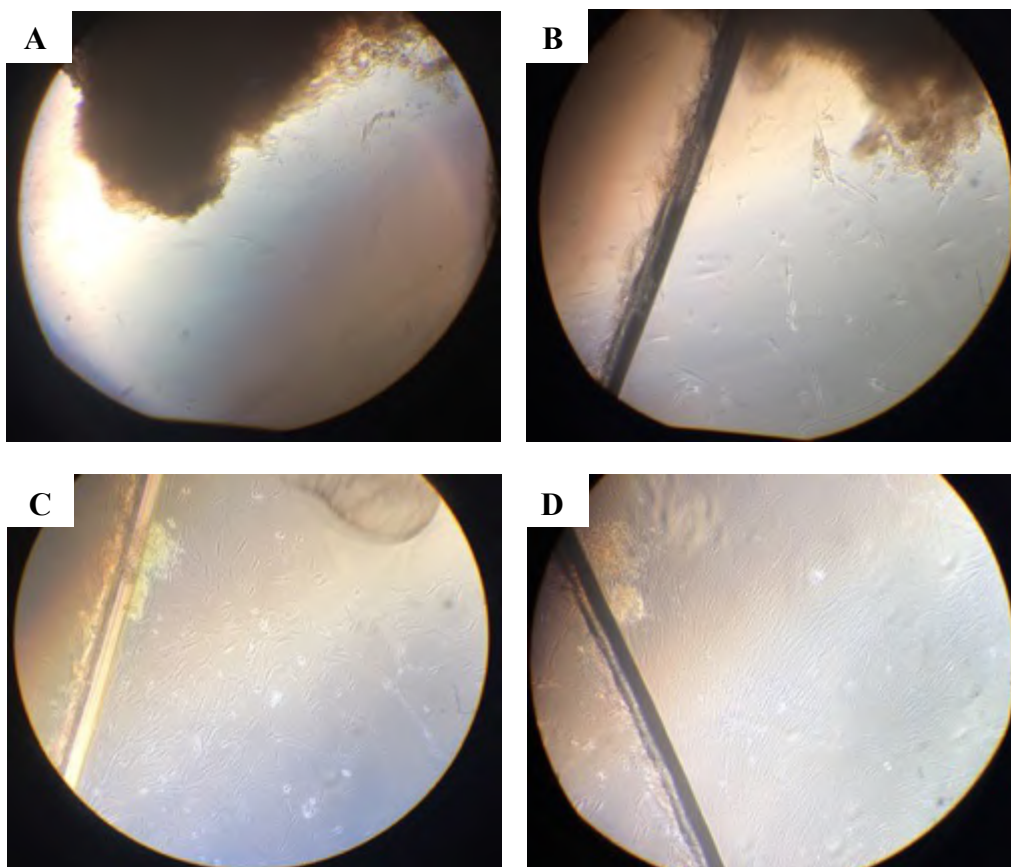


Figura 29. Obtención de fibroblastos dérmicos humanos a partir de explantes de piel. Las fotografías fueron tomadas en un microscopio óptico con aumento 10X al día 14 (A), día 16 (B), día (21) y día 30 (D) post-explante.

6.4.3. Viabilidad celular

Se evaluó la viabilidad celular de los FDHs a concentraciones entre 0,1 – 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ para los EETs y entre 0,1 – 80 $\mu\text{g}/\text{mL}$ para los EAEs, utilizando dos metodologías diferentes. En primer lugar, se evaluó el efecto de vehículo de los extractos (DMSO 1%) sobre la viabilidad de los FDHs, determinando que no existen diferencias significativas entre el control sin tratamiento (DMEM/F-12) y la viabilidad celular obtenida con DMEM/F-12 + DMSO al 1% (**Figura 30**). De acuerdo a este resultado, los análisis estadísticos de los siguientes ensayos se realizaron utilizando DMSO 1% como control negativo.

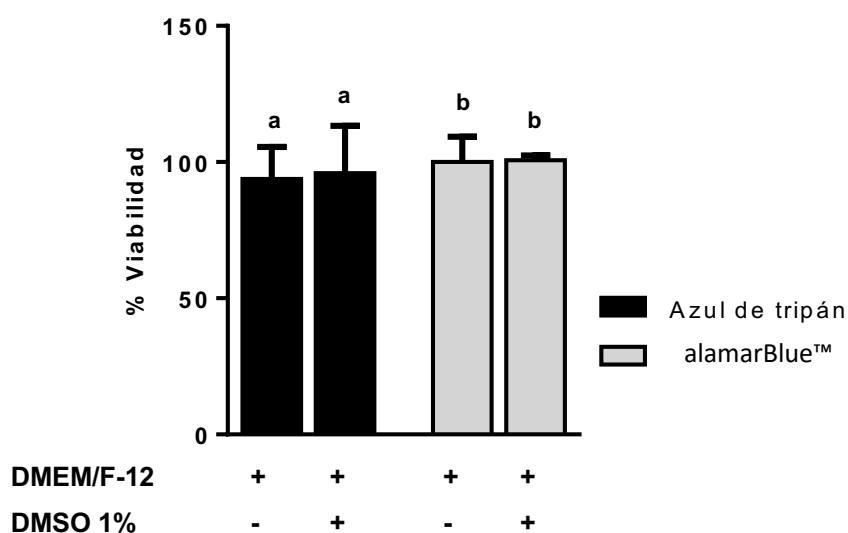


Figura 30. Efecto del vehículo (DMSO 1%) sobre la viabilidad celular de FDHs a las 24 h, determinado mediante los ensayos de exclusión con azul de tripán y AlamarBlue™. No se observaron diferencias significativas entre el control sin tratamiento (DMEM/F-12) y el solvente (DMSO 1%) para cada ensayo de viabilidad (letras iguales indican un $p > 0,05$), calculado con la prueba t-Student. Todos los valores corresponden al promedio de 5 experimentos independientes ($n=5$) \pm DE. El signo + indica presencia de un tratamiento o reactivo; el signo - indica ausencia de un tratamiento o reactivo. Control negativo: DMEM/F-12; control del vehículo: DMSO 1%.

La **Figura 31** muestra los resultados de viabilidad obtenidos mediante el ensayo fluorimétrico con el reactivo de AlamarBlue™ y la **Figura 32** muestra los resultados obtenidos mediante conteo celular por exclusión con azul de tripán. Mediante ambas técnicas, los extractos de los dos genotipos presentaron citotoxicidad a altas concentraciones: mayores a 25 $\mu\text{g/mL}$ para los EETs y mayores a 5 $\mu\text{g/mL}$ para los EAEs, siendo los extractos del G. 19-2 los que obtuvieron menores CL_{50} (**Tabla 13**).

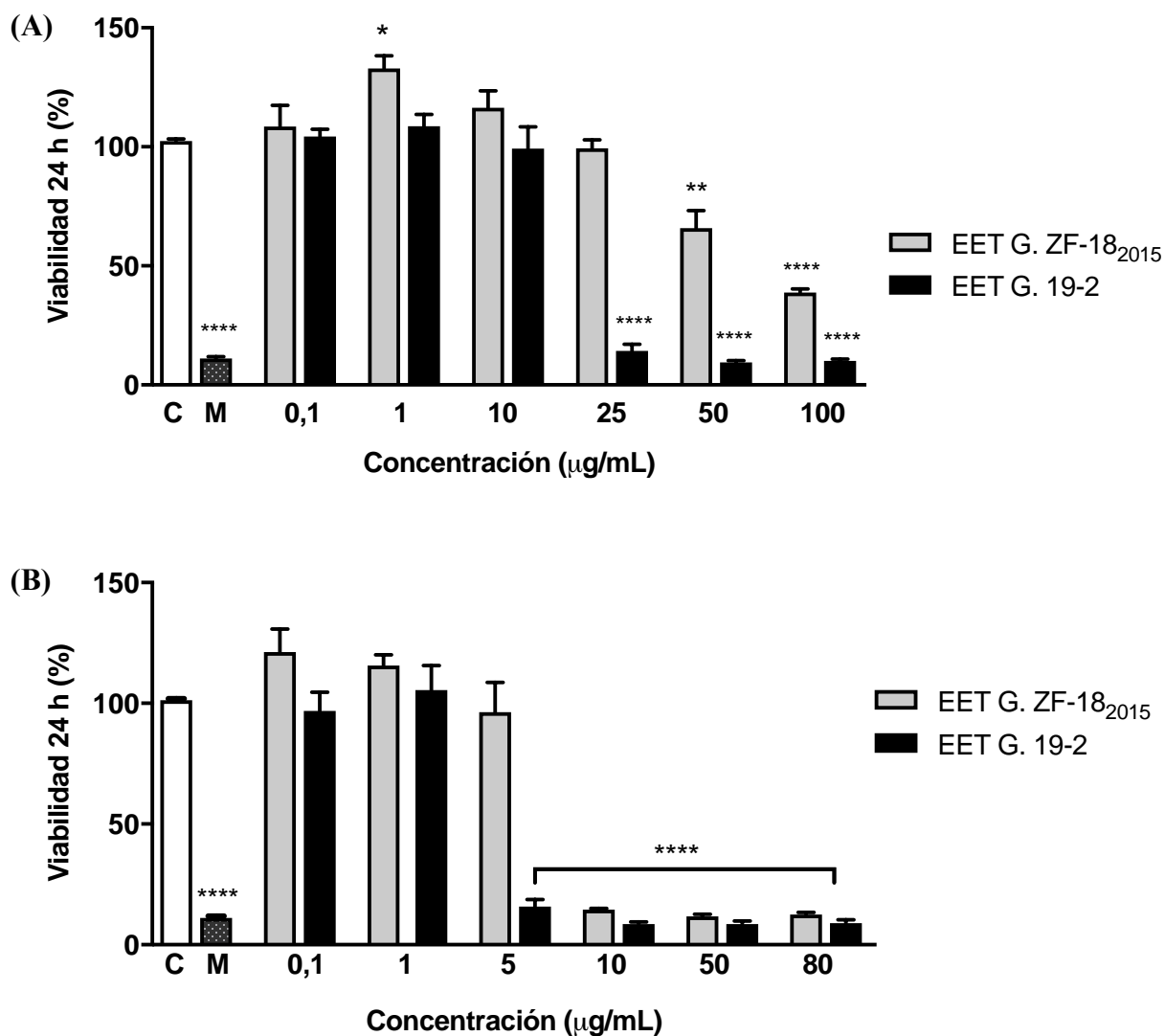


Figura 31. Viabilidad celular de FDHs a las 24 h determinada mediante el ensayo de alamarBlue™. Efecto sobre la viabilidad de FDHs tratados con los EETs (A) y EAEs (B) de hojas de murtilla correspondientes al G. ZF-18₂₀₁₅ y G.19-2. Los valores se presentan como el promedio de tres experimentos independientes (n=3) ± DE. **p<0,01, ****p<0,0001 significa que existen diferencias significativas respecto al control, calculado con ANOVA de una vía y test de Dunnett. C: control del vehículo (DMSO 1%). M: control de muerte celular (H₂O₂ 1mM).

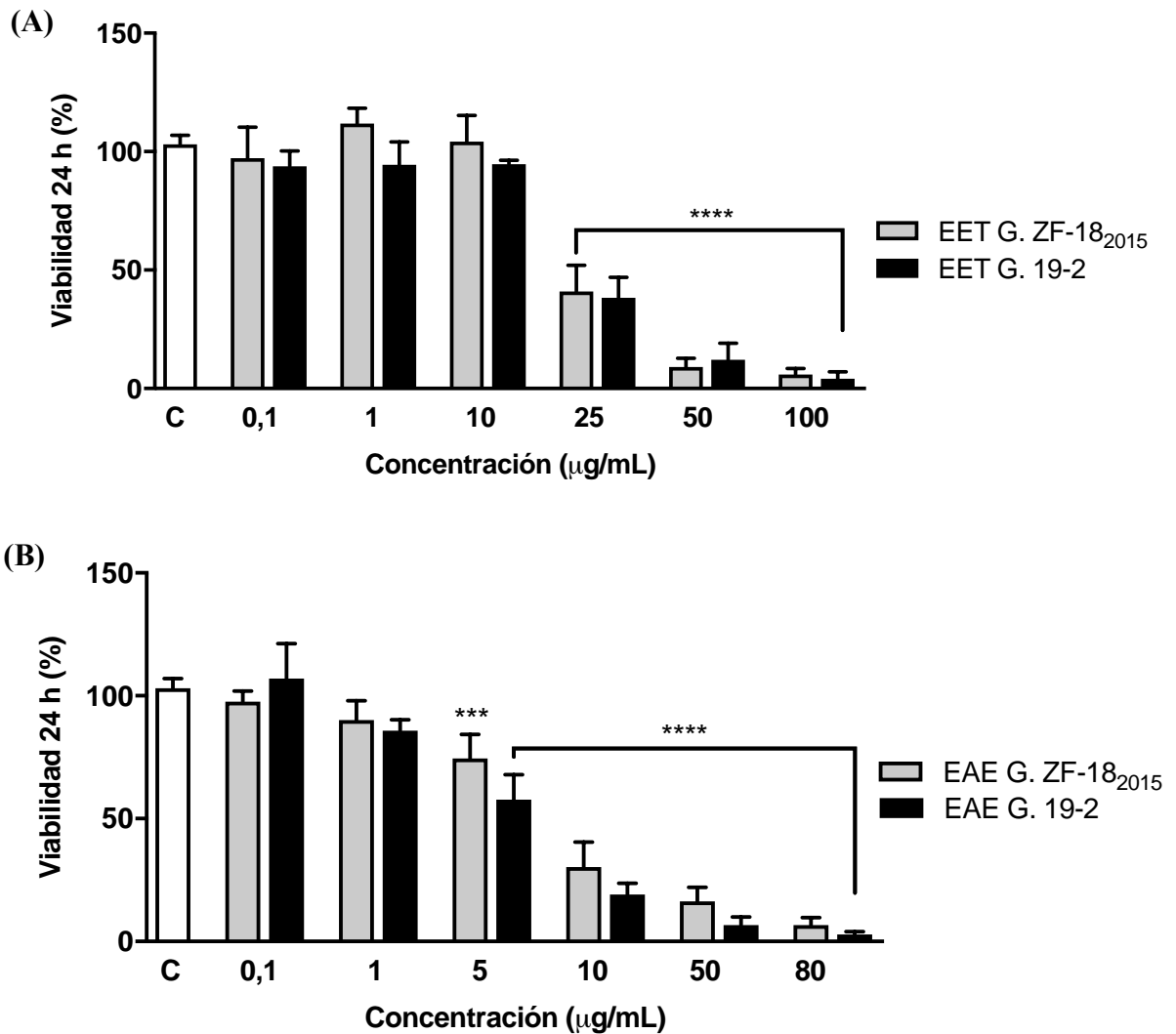


Figura 32. Viabilidad celular de FDHs a las 24 h determinada mediante exclusión con azul de tripán. Efecto sobre la viabilidad de FDHs tratados con los EETs (A) y EAEs (B) de las hojas de murtila correspondientes al G. ZF-18 y G.19-2. Los valores se presentan como el promedio de 3 experimentos independientes ($n=3$) \pm DE. *** $p<0,001$, **** $p<0,0001$ significa que existen diferencias significativas respecto al control, calculado con ANOVA de una vía y test de Dunnett. C: control del vehículo (DMSO 1%).

La mayor diferencia entre las CL₅₀ de cada metodología se obtuvo con el EET del G. ZF-18₂₀₁₅ a las concentraciones de 25 y 50 µg/mL (**Figura 33**), donde se determinó una menor viabilidad en la técnica por conteo celular, en comparación a la viabilidad obtenida por fluorimetría. Esta diferencia se puede deber a que en la primera técnica es necesario utilizar tripsina 1X para despegar las células de las placas de cultivo y, posteriormente, contar las células vivas en una cámara de *Neubauer*. En este proceso, las células tratadas con los EETs del G. ZF-18₂₀₁₅ a las concentraciones de 25 y 50 µg/mL exhibieron una mayor adherencia a la placa de cultivo y no se soltaron luego de la tripsinización (incluso después de 15 min), por lo que al momento de contar las células el número de éstas fue menor y, en consecuencia, el resultado de la viabilidad también fue afectado. Este efecto de aumento en la adhesión no se encuentra descrito en la literatura para extractos polares de especies vegetales; sin embargo, existen trabajos donde se han utilizado recubrimientos sintéticos para cultivos celulares, funcionalizados con compuestos que poseen varios grupos hidroxilos en su estructura, como polidopamina, ácido tánico, ácido hidrocaféico y pirocatecol. Se encontró que estos recubrimientos aumentan la adherencia de fibroblastos, y de otros tipos celulares, sobre la superficie de cultivo, siendo mayor la fuerza de adhesión a mayor número de grupos hidroxilos (Lee et al., 2017, Ku et al. 2010). Posiblemente, la superficie funcionalizada aumentaría los enlaces por puentes de hidrógeno entre los componentes celulares y los abundantes grupos hidroxilos del recubrimiento, mejorando la adhesión celular. Esto podría explicar el efecto observado con los EETs del G. ZF-18₂₀₁₅ sobre la adhesión de los FDHs, el cual, a diferencia de los demás extractos, posee una mayor cantidad de taninos que se caracterizan estructuralmente por poseer un gran número de grupos hidroxilos.

Tabla 13. Valores de concentración letal 50 (CL₅₀) de los EETs y EAEs sobre fibroblastos dérmicos humanos, obtenidos con las metodologías de exclusión con azul de tripán y el ensayo de alamarBlue™

	CL ₅₀ (µg/mL) EET ZF-18 ₂₀₁₅	CL ₅₀ (µg/mL) EAE ZF-18 ₂₀₁₅	CL ₅₀ (µg/mL) EET 19-2	CL ₅₀ (µg/mL) EAE 19-2
Azul de tripán	22,9 ± 2,5	8,1 ± 2,6	23,8 ± 2,0	9,5 ± 1,7
alamarBlue™	76,6 ± 4,9	14,0 ± 3,7	18,6 ± 3,8	3,2 ± 0,7

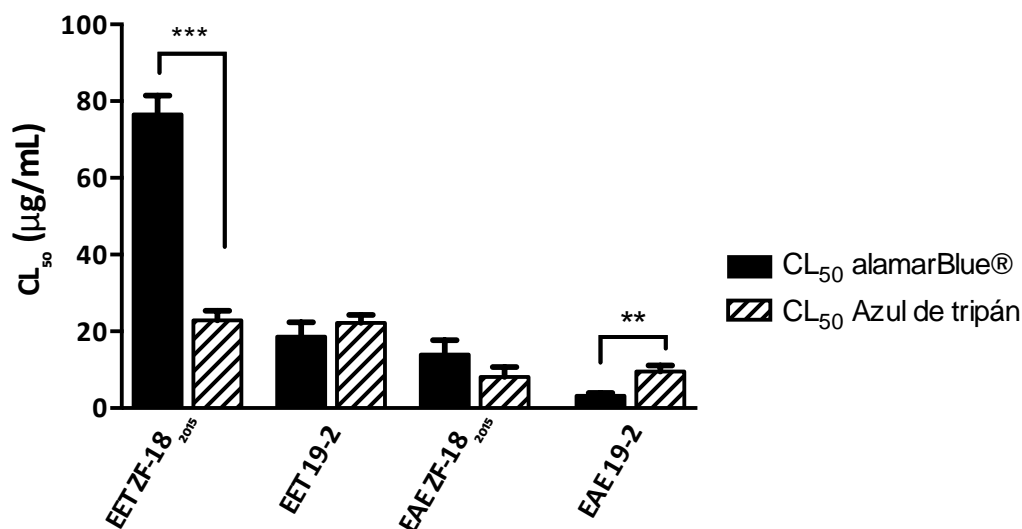


Figura 33. Concentración Letal 50 (CL₅₀) de los EETs y EAEs de hojas de murtila de los genotipos ZF-18₂₀₁₅ y 19-2, determinada mediante los ensayos de alamarBlue™ y exclusión con azul de tripán. *p<0,001 y **<0,01 entre los valores obtenidos por ambas metodologías para una misma muestra, calculado a través de la prueba estadística T-Student.**

En relación a los resultados de la CL₅₀, los EAEs de ambos genotipos fueron más tóxicos para los FDHs que los EETs, efecto que podría deberse a la mayor liposolubilidad de los compuestos triterpénicos presentes en estos extractos. Se ha reportado que algunos TPCs que se encuentran identificados en los EAEs de las hojas de murtila, como los ácidos ursólico y oleanólico, poseen actividad citotóxica frente a distintas líneas celulares neoplásicas (Chudzik et al., 2015). Además, se ha reportado que algunos de los TPCs identificados en las hojas de murtila son citotóxicos para fibroblastos dérmicos a concentraciones mayores de 10 µg/mL (Tan et al., 2017). Además, se ha reportado que flavonoides identificados en este extracto, como quercetina y canferol, han demostrado ser citotóxicos para cultivos de células humanas principalmente por aumentar los niveles intracelulares de especies reactivas del oxígeno (ERO) a concentraciones altas (Matsuo et al., 2005), lo que también podría explicar los efectos tóxicos de los EAEs a las concentraciones evaluadas en este estudio.

Finalmente, y de acuerdo a los resultados obtenidos en los estudios de viabilidad utilizando ambas metodologías, se seleccionaron las dos concentraciones más altas de cada uno de los

extractos, que no provocaron muerte celular, para evaluarlas en los siguientes ensayos celulares. Para los EETs se seleccionaron las concentraciones de 1 y 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ y para los EAEs 0,1 y 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$. Se descartó la concentración de 25 $\mu\text{g}/\text{mL}$ para el EET del G.ZF-18 debido a la diferencia en el % de viabilidad obtenido por la metodología con azul de tripán.

6.4.4. Migración celular por el método de la herida (*Scratch assay*)

En primer lugar, se implementó la metodología de migración celular con los FDHs utilizando BrdU 0,1 mM como inhibidor de la proliferación y SFB 10% como control positivo para inducir la migración. La **Figura 34** muestra que en presencia de DMEM/F-12 los fibroblastos presentaron una escasa migración, mientras que los resultados obtenidos con SFB 10% muestran que a las 24 h la herida se cierra casi por completo, con un $91,4 \pm 3,0$ % de reducción del área. Al agregar BrdU 0,1 mM, el área cubierta fue un poco menor y se produjo una reducción del $72,3 \pm 4,4$ %, sugiriendo que la proliferación de los fibroblastos influye en alrededor de un 20% en el cierre de la herida en 24 h. Por otro lado, se evaluó el efecto de DMSO 1% sobre el porcentaje de área no cubierta de la herida, determinando que no existen diferencias significativas ($p > 0,05$) en comparación al control con DMEM/F-12.

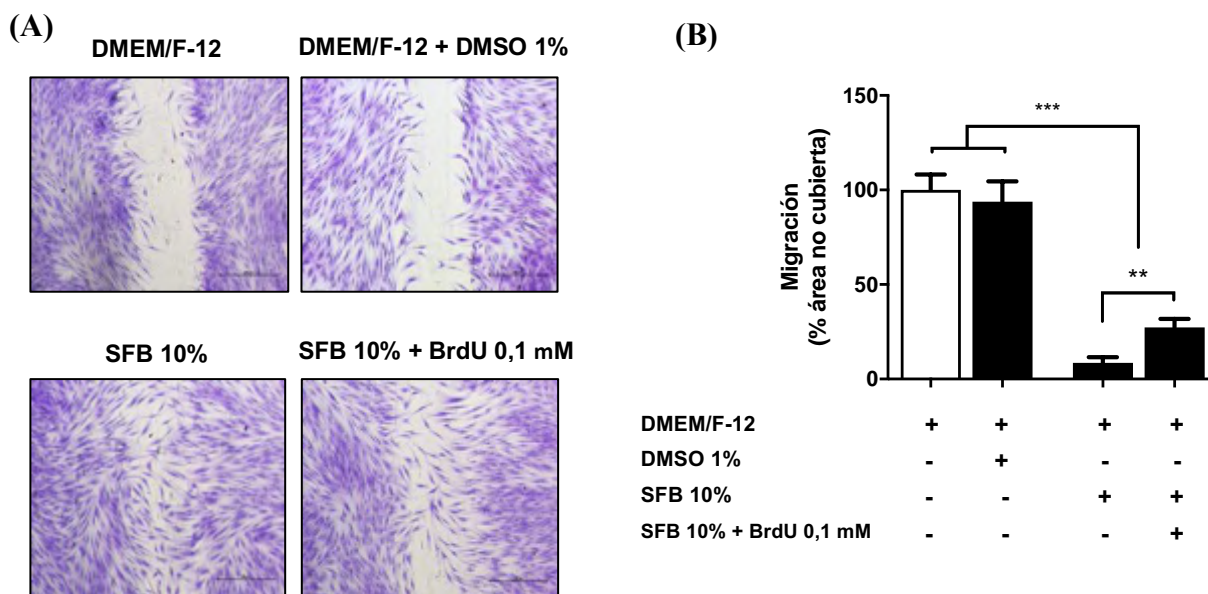


Figura 34. Migración de fibroblastos dérmicos humanos mediante el método de la herida *in vitro*. (A) Se realizó una herida en una monocapa de FDHs confluentes y se dejaron incubando a 37° con cada tratamiento. Se permitió que las células migraran a la herida por 24 h, tiempo después del cual fueron fijadas y teñidas con cristal violeta 0,3 %. Finalmente, se sacaron fotografías a 4 campos de cada placa de cultivo en un microscopio inverso acoplado a una cámara digital con aumento 4X. (B) Porcentaje (%) de área no cubierta por células presentado como el promedio de tres experimentos independientes (n=3). **p<0,01 fue calculado con la prueba t-student y ***p<0,001 fue calculado con ANOVA de una vía y test de comparaciones múltiples de tukey. El signo + indica presencia de un tratamiento o reactivo; el signo - indica ausencia de un tratamiento o reactivo. Control negativo: DMEM/F-12; control del vehículo: DMSO 1%; inhibidor de la proliferación: BrdU 0,1 mM.

En la **Figura 35** se muestran los resultados del ensayo de la herida *in vitro* obtenidos por los extractos de murtilla de ambos genotipos, evidenciando que los EETs y EAEs de ambos genotipos a la concentración de 1 µg/mL fueron los extractos que obtuvieron los mejores resultados, promoviendo la migración de FDHs y generando un cierre de la herida entre un 30-40 %. Este efecto; sin embargo, fue inferior a la migración celular promovida por SFB 10%, el cual fue capaz de producir un cierre casi total de la herida a las 24 h (**Figura 31-A**). Por su parte, el EET del G. ZF-18₂₀₁₅ a 10 µg/mL fue el único extracto que no promovió migración celular y no obtuvo diferencias estadísticamente significativas con el control negativo (DMEM/F-12 + DMSO 1%). En general, en los EETs se observa una tendencia dosis-respuesta inversamente proporcional, donde la mayor concentración de extracto no tiene efecto o su efecto es inferior a

la concentración más baja. En el trabajo de Parkar et al. (2017) se observó la misma tendencia en fibroblastos dérmicos de rata tratados con un extracto metanólico de *Terminalia sericea*, donde se identificó entre sus compuestos la presencia de un tanino elágico. Este resultado lo asocian principalmente al efecto citotóxico del extracto; sin embargo, de acuerdo con los resultados de citotoxicidad evaluados mediante los ensayos con azul de tripán y alamarBlue™, los EETs del G. 19-2 y ZF-18₂₀₁₅ no disminuyen la viabilidad celular de los FDHs a 10 µg/mL, por lo que no serían tóxicos esta concentración.

A este respecto, los fenómenos de migración están gobernados principalmente por la familia de las proteínas Rho GTPasa los que se han involucrado en la formación del citoesqueleto de actina en células de fibroblastos de mamíferos; mientras que los de proliferación por ciclinas como quinasas dependientes de ciclina (Cdk). Respecto a esto, se ha determinado que un extracto acuoso *Citrus tamurana*, un fruto cítrico japonés, es capaz de incrementar los niveles de distintas proteínas Rho GTPasas y la expresión de genes de Cdk1 y Cdk2 (Harishkumar M. et al., 2013), en una línea celular de fibroblastos dérmicos humanos, lo que podría explicar el mecanismo que tienen algunos polifenoles de promover la migración celular. Por otro lado, se ha determinado que altas concentraciones de taninos podrían disminuir la actividad enzimática y de otras proteínas como resultado de una interacción por complejación, inhibiendo su acción o incluso modulándola (Adamczyk M et al., 2017). Esta evidencia podría explicar el nulo efecto del EET G. ZF-18₂₀₁₅ sobre la migración de los FDHs a 10 µg/mL, considerando que este extracto fue el que obtuvo la mayor cantidad de taninos totales.

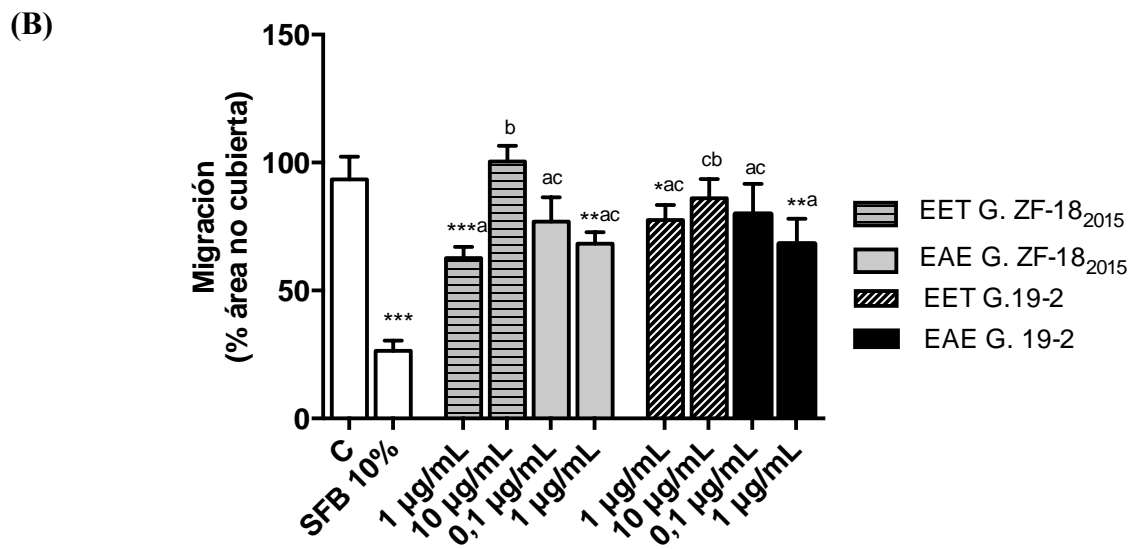
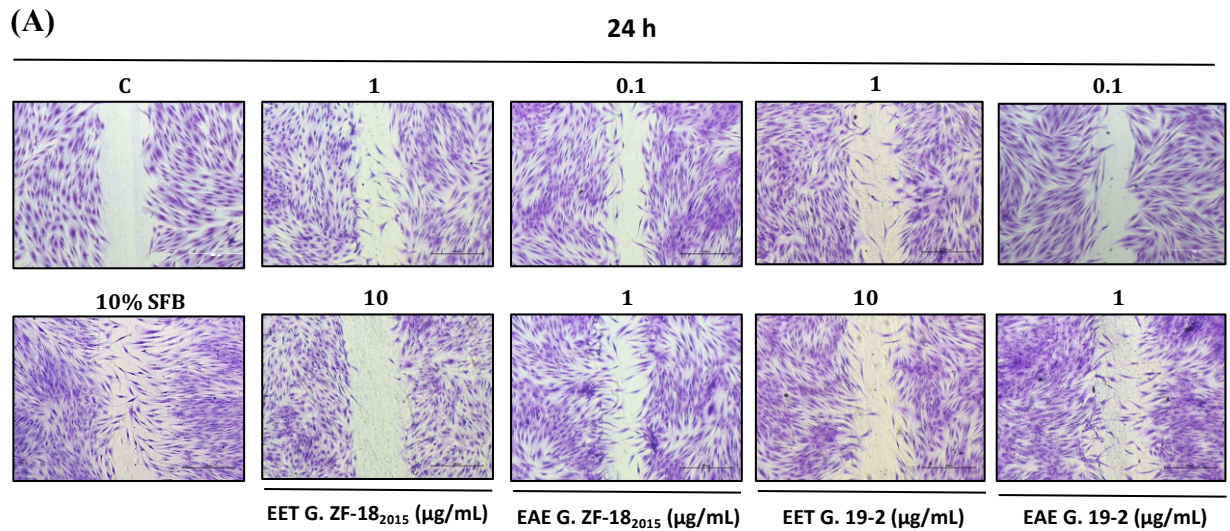


Figura 35. Efecto de los EETs y EAEs de los genotipos ZF-18₂₀₁₅ y 19-2 de hojas de murtila sobre la migración de FDHs. Se realizó una herida a una monocapa de FDHs y trataron durante 24 h con los distintos extractos. Luego de este tiempo, las células se tiñeron con cristal violeta y se tomaron fotografías a 4 campos de cada placa de cultivo, utilizando un microscopio invertido acoplado a una cámara digital (aumento 4X). (A) Fotografías representativas de la migración de los FDHs después de 24 h de tratamiento. (B) Porcentaje (%) de extensión de la herida (n=4). ^{a,b,c} Letras diferentes representan diferencias significativas respecto al resto de las muestras, calculado con ANOVA de una vía y el test de comparaciones múltiples de Tukey (p<0,05). *p<0,05; **p<0,01; ***p<0,001 respecto al control analizado con ANOVA de una vía seguido del test de Dunnett. C: Control vehículo (DMSO 1%). SFB: Suero Fetal Bovino (Control positivo).

Por otro lado, cabe destacar que los EAEs fueron activos a concentraciones bajas, incluso a 0,1 $\mu\text{g/mL}$, promoviendo un cierre de la herida entre un 20-30% luego de 24 h de tratamiento. Entre los flavonoides identificados en mayor proporción en estos extractos se encuentran diversos heterósidos de quercetina, canferol y miricetina. Respecto a esto, Moghadam et al. (2017) demostraron que un glicósido de miricetina (miricetina-3-O-ramnósido) era capaz de incrementar al doble la velocidad de cierre de una herida *in vitro* por aumentar la migración de fibroblastos dérmicos. Estos extractos, además de estar compuestos por flavonoles y heterósidos flavónicos, presentan una mayor concentración de triterpenos pentacíclicos (TPCs) como ácido asiático, ácido madecásico, ácido maslínico y la mezcla de los ácidos ursólico y oleanólico. Los compuestos triterpénicos han sido asociados a efectos positivos sobre la cicatrización cutánea debido a su actividad sobre la proliferación y migración de fibroblastos dérmicos. Kuonen et al. (2013), determinó que el ácido oleanólico, un TPC identificado en los EAEs de ambos genotipos de murtilla, aumentó la migración de una línea celular de fibroblastos dérmicos en un 37,1 % respecto al control sin tratamiento en el mismo ensayo de la herida *in vitro*. Así mismo, numerosos estudios han demostrado la actividad cicatrizante de los TPCs de la *Centella asiatica*, entre los cuales el asiaticósido ha demostrado aumentar la migración de fibroblastos dérmicos *in vitro* (Bylka et al., 2014). Estos compuestos, por lo tanto, podrían estar potenciando el efecto sobre la migración de los FDHs a concentraciones bajas.

6.4.5. Adhesión celular

Debido a la importancia del proceso migración y, posteriormente, de adhesión a la zona de la piel dañada, previas a la síntesis de proteínas de la MEC, se propuso evaluar el efecto de los EETs y EAEs seleccionados sobre la adhesión de los FDHs luego de ser tratados con los extractos durante 24 h.

En primer lugar, se presenta la curva de calibración con cristal violeta realizada con un número entre 5.000-100.000 células/pocillo (**Figura 36**) con la cual se determinó el número óptimo de fibroblastos para sembrar en el ensayo de adhesión. Para la estandarización de este protocolo, se debía tener en cuenta que a las 2 horas de incubación no se iba a producir la adhesión de todos los fibroblastos sembrados, por lo que se escogió un número de 60.000 células/pocillo,

obteniendo alrededor de 30.000 células sin tratamiento adheridas después de 2 h (cantidad de células cuya absorbancia se encontraba dentro del rango lineal de la curva de calibración).

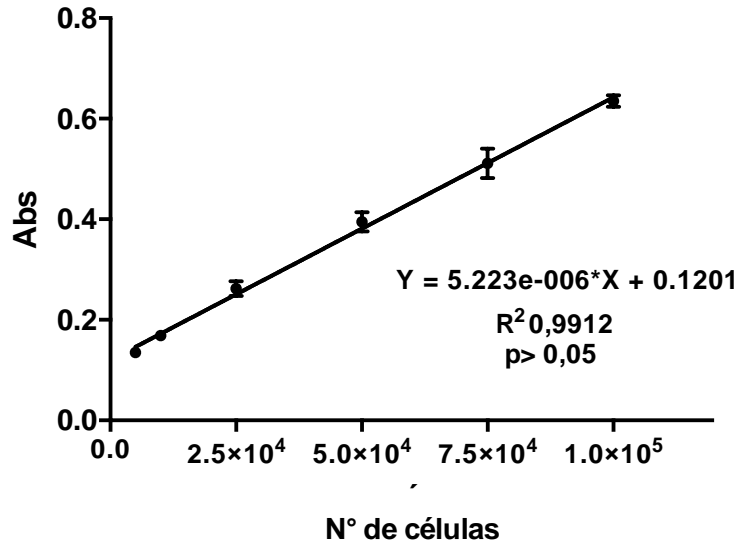


Figura 36. Curva de calibración con cristal violeta para el ensayo de adhesión celular. A través de esta curva de calibración (n=3), la cual se realizó mediante una tinción de los FDHs con cristal violeta 0,3% p/v, se determinó el número necesario de fibroblastos dérmicos para sembrar en el ensayo de adhesión (60.000 células/pocillo) y, mediante interpolación en la ecuación de la recta, se obtuvo la cantidad de células adheridas a la placa de cultivo luego de 2 h de incubación a 37° C y 5% CO₂. La medición de absorbancia se realizó en un espectrofotómetro de microplacas a $\lambda=595$ nm. El análisis estadístico se realizó mediante el *Run test* de linealidad, indicando que los datos se ajustan a un modelo lineal ($p>0,05$).

La **Figura 37** muestra el efecto de los extractos de ambos genotipos sobre la adhesión de FDHs, donde ambos EAes a la concentración de 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ aumentaron la adhesión de los fibroblastos dérmicos de igual forma que el control positivo (SFB 10%). Por su parte, dentro de los extractos etanólicos, sólo el EET del G.19-2 a la concentración de 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ fue capaz de aumentar la adhesión de igual forma que los EAes.

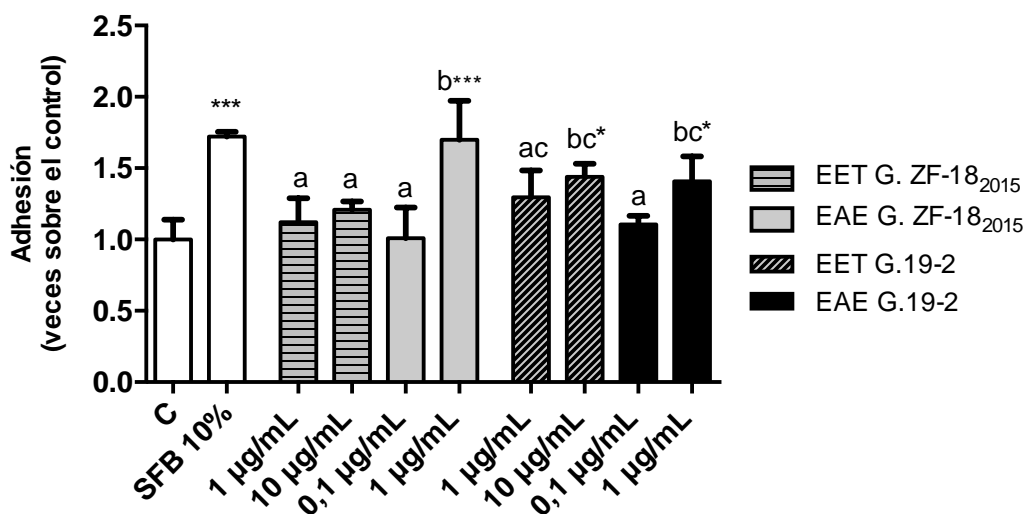


Figura 37. Efecto de los EETs y EAEs de hojas de murtila de los genotipos ZF-18₂₀₁₅ y 19-2 sobre la adhesión de FDHs. Las células fueron tratadas con los extractos durante 24 h en DMEM/F-12, se tripsinizaron y se volvieron a sembrar para evaluar su adhesión sobre la matriz plástica de una placa de cultivo durante 2 h de incubación. Luego de este tiempo, las células fueron fijadas y teñidas con cristal violeta. Los resultados se presentan como el promedio de cuatro experimentos independientes (n=4) ± DE. *p<0.05, ***p<0.001 respecto al control del vehículo (DMEM/F-12+ DMSO 1%), calculado con ANOVA de una vía y test de Dunnet. ^{a,b,c,d}Letras diferentes representan diferencias significativas respecto al resto de las muestras, calculado con ANOVA de una vía y el test de comparaciones múltiples de Tukey (p<0,05).

La adhesión celular ocurre en tres etapas, las cuales involucran la adherencia de las células en la superficie (*attachment*), su extensión (*spreading*) y finalmente la formación de adhesiones focales y fibras de estrés. En la literatura consultada no se encontró información respecto a efectos positivos sobre la adhesión celular de compuestos fenólicos identificados en los extractos; al contrario, los estudios han demostrado que algunos flavonoides son capaces de inhibir la adhesión celular, principalmente de células del sistema inmune (Maleki et al. 2019). De acuerdo a esto, el efecto observado probablemente se pueda explicar a la presencia de TPCs, siendo el EAE G. ZF-18 el cual mostró una mayor cantidad de ácido asiático y ácido madecásico. Se ha reportado que el asiaticósido, una saponina de la *Centella asiatica* cuya genina es el ácido asiático (Figura 38), aumenta las primeras etapas de la adhesión de fibroblastos dérmicos, incrementando en un 40% las células adheridas luego de 6 horas de

incubación (Lee et al., 2012). Si bien en la literatura consultada esta saponina no se encuentra identificada en las hojas de murtila y en la unidad de investigación que realicé en el programa de Doctorado tampoco fue posible identificarla mediante cromatografía en capa fina (CCF) ni mediante CLAE-DAD (ANEXOS 8 y 9), sí se encuentran identificados los ácidos asiático y madecásico tanto en el EAE G. ZF-18₂₀₁₅ como en el EAE G. 19-2 (Arancibia-Radich et al., 2016), los cuales podrían estar involucrados en el aumento de la adhesión temprana de los FDHs tratados con los EAEs. Cabe destacar que el incremento en la adhesión luego de 24 h de incubación con los extractos fue de un 70% respecto de la condición control, al igual que el resultado obtenido con SFB 10%. Por otro lado, no hubo diferencias significativas en el efecto obtenido por ambos EAEs, por lo que el resultado no se relacionaría a sus diferencias en la composición de TPCs.

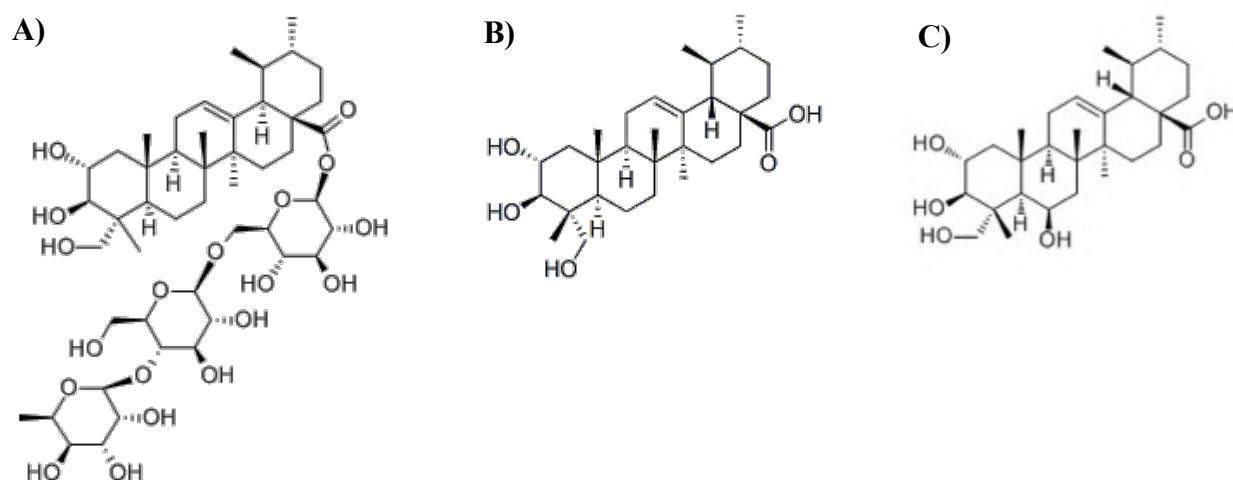


Figura 38. Estructuras químicas de TPCs con actividad cicatrizante. A) asiaticósido, compuesto activo de la *Centella asiatica*, B) ácido asiático y C) ácido madecásico.

Finalmente, en relación al efecto obtenido por los EETs, solamente se observó un aumento significativo de la adhesión en el EET G. 19-2 a la concentración de 10 $\mu\text{g/mL}$. Este extracto, a diferencia del EET G.ZF-18₂₀₁₅, posee una menor concentración de fenoles y taninos totales; sin embargo, presenta una mayor cantidad de flavonoides totales ($34,5 \pm 0,5$ mg quercetina/g ES v/s $20,3 \pm 0,3$ mg quercetina/g ES) (Peña-Cerda et al., 2017). Moskot et al. (2015) demostraron que algunos flavonoides son capaces de modular genes que traducen proteínas que

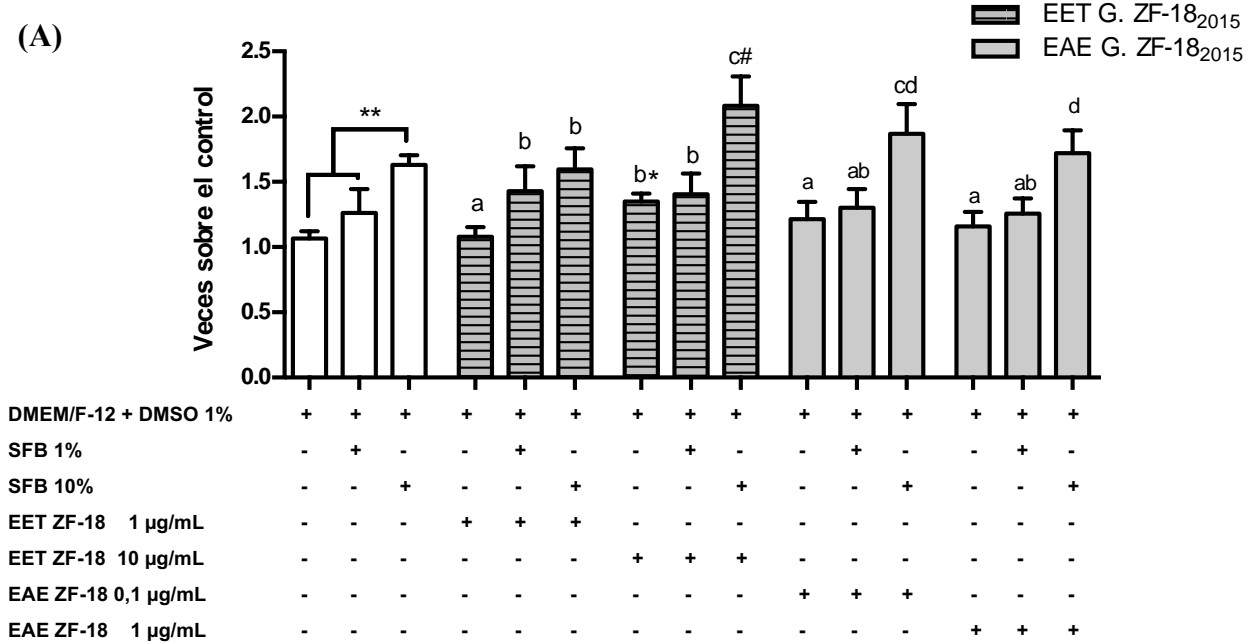
participan en la síntesis de glicosaminoglicanos (GAGs), los cuales participan en la adhesión celular de fibroblastos dérmicos. Este resultado podría explicar, en parte, el efecto obtenido por el EET G. 19-2; sin embargo, se necesitan más estudios al respecto.

6.4.6. Proliferación celular

Después de que se produce una herida, los fibroblastos dérmicos comienzan a proliferar en el sitio dañado por acción de diversos factores de crecimiento, entre los cuales destaca la familia de factores de crecimiento de fibroblastos (FGFs), los cuales participan en diversos procesos celulares, como proliferación, migración y diferenciación celular a través de la activación de receptores de tirosina quinasa de alta afinidad (FGFR) y una clase de receptores de baja afinidad, los proteoglicanos de heparán sulfato (HSPG) (Boilly et al., 2000). Al tercer día después del daño, la cicatriz se encuentra con una alta población de estas células (Harper et al., 2014). Debido a la importancia los FDHs durante la etapa proliferativa de la cicatrización, se evaluó el efecto de los EETs y EAEs de los genotipos ZF-18₂₀₁₅ y 19-2 sobre el crecimiento de la población celular luego de 24 h de tratamiento con los extractos.

Las **Figuras 39-A** y **39-B** muestran los resultados de proliferación celular obtenidos por los FDHs tratados con los EETs y EAEs por 24 h. En primer lugar, se observa un aumento dosis-dependiente de la población celular a concentraciones crecientes de SFB, incrementando en alrededor de 1.7 veces en presencia de SFB 10% respecto al control (DMSO 1%). En relación a los resultados de las células tratadas con los extractos, en condiciones de SFB 1% no se encontraron diferencias estadísticamente significativas respecto al control; sin embargo, en presencia de SFB 10%, los EETs de ambos genotipos a la concentración de 10 µg/mL aumentaron significativamente la proliferación celular ($p < 0,05$).

(A)



(B)

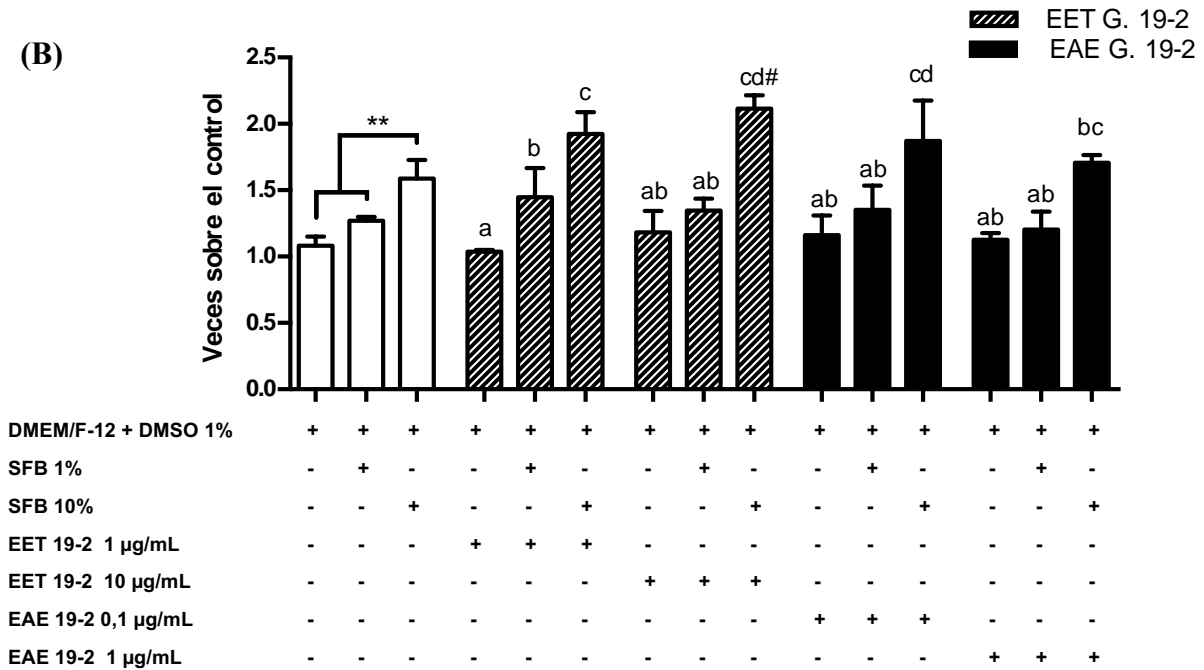


Figura 39. Efecto a las 24 h de los EETs y EAEs del G. ZF-18₂₀₁₅ (A) y 19-2 (B) sobre la proliferación de FDHs a distintas concentraciones de Suero Fetal Bovino (SFB). Las células se trataron con los extractos en presencia de SFB al 1 y 10% durante 24 h. Los resultados se presentan como el promedio de tres experimentos independientes (n=3) ± DE. **p<0,01, *p<0,05 respecto al control del vehículo (DMEM/F-12 + DMSO 1%). #p<0,05 respecto al control SFB 10%, calculado con ANOVA de una vía y el test de Dunnnett. ^{a,b,c,d}Letras diferentes en cada gráfico representan diferencias significativas respecto al resto de las muestras, calculado con ANOVA de una vía y el test de

comparaciones múltiples de Tukey ($p < 0,05$). El signo + indica la presencia de un tratamiento o reactivo; el signo - indica la ausencia de un tratamiento o reactivo.

Los EETs de ambos genotipos no presentaron diferencias significativas ($p > 0,05$) al compararlos a una misma concentración de extracto y de SFB. En relación a esto, se ha reportado que extractos ricos en taninos y elagitaninos son capaces de actuar como mitógenos sobre fibroblastos y queratinocitos (Agyare et al., 2011), lo cual podría explicar el efecto observado por los EETs. Estos extractos concentran en mayor proporción compuestos de tipo fenólicos y, en particular, taninos hidrolizables derivados de los ácidos gálico y elágico (Peña-Cerda et al., 2017). A pesar de que los EETs de ambos genotipos presentaron diferencias en su composición de polifenoles, siendo el EET G. ZF-18 quien obtuvo la mayor cantidad de estos compuestos, los dos extractos presentaron el mismo efecto sobre la proliferación de los FDHs a la concentración de 10 $\mu\text{g/mL}$ y en presencia de SFB 10%.

Respecto a los EAEs, éstos presentaron una tendencia a aumentar la proliferación de los fibroblastos a una concentración de 0,1 $\mu\text{g/mL}$ en presencia de SFB 10%; sin embargo, los resultados no fueron estadísticamente significativos. Al igual que en los EETs, al comparar el efecto de los EAEs de ambos genotipos no se obtuvieron diferencias, por lo que no es posible determinar una correlación entre el efecto sobre la proliferación y las diferencias en la composición química de los extractos.

En la literatura consultada no se encontró información respecto al mecanismo por el cual los extractos de especies vegetales podrían aumentar la proliferación de fibroblastos dérmicos. Dinda et al. (2016) señala que tinturas y extractos polares de *Calendula officinalis*, en los cuales se han identificado compuestos como quercetina-3-O-glucósido, rutina, ácido oleanólico, entre otros, aumentarían la proliferación de fibroblastos dérmicos mediante la activación de la vía de señalización promitogénica PI3K (fosfatidilinositol-3-kinasa). Algunos de estos compuestos están presentes en los EETs de las hojas de murtila estudiados; sin embargo, es necesario realizar otros estudios para comprender y definir el mecanismo por el cual estos extractos estarían activando vías de proliferación celular en los FDHs.

6.4.7. Viabilidad celular de los FDHs a las 72 h

Para la evaluación del efecto de los extractos de murtila sobre los niveles de expresión de las proteínas de la matriz extracelular (MEC) se determinó, de acuerdo a resultados previos en el Laboratorio de Farmacología y Toxicología y al trabajo de Weber et al. (2009), que el tiempo de tratamiento con el control positivo (TGF- β 10 ng/mL) para la validación de los ensayos debía ser de 72 h. En este tiempo se promueve la diferenciación de fibroblastos a miofibroblastos y también, en consecuencia, un aumento significativo de las proteínas de la MEC. Debido a esto y a que los ensayos celulares anteriores se realizaron por 24 h, se debió evaluar la viabilidad de los FDHs en presencia de los EETs y EAEs durante 72 h. La metodología utilizada fue el ensayo de alamarBlue™ y se evaluaron los extractos en presencia de DMSO a concentraciones de 1 y 0,1 %, con el fin de determinar el efecto de la concentración del vehículo sobre la viabilidad de las células luego de 72 h.

La **Figura 40** muestra los resultados obtenidos de viabilidad celular (%) de los FDHs luego de tratarlos durante 72 h con los EETs y EAEs de los genotipos ZF-18₂₀₁₅ y 19-2. En primer lugar, el vehículo de los extractos (DMSO) a la concentración del 1% produjo una disminución de la viabilidad celular de aproximadamente un 20% a las 72 h. Debido a esto, se decidió escoger la concentración de DMSO al 0,1% para vehiculizar los extractos en los ensayos de expresión de proteínas de la MEC mediante western blot. Cabe resaltar que a esta concentración no se presentaron problemas de solubilidad ya que las concentraciones de extractos utilizadas en estos ensayos fueron bajas (1 μ g/mL).

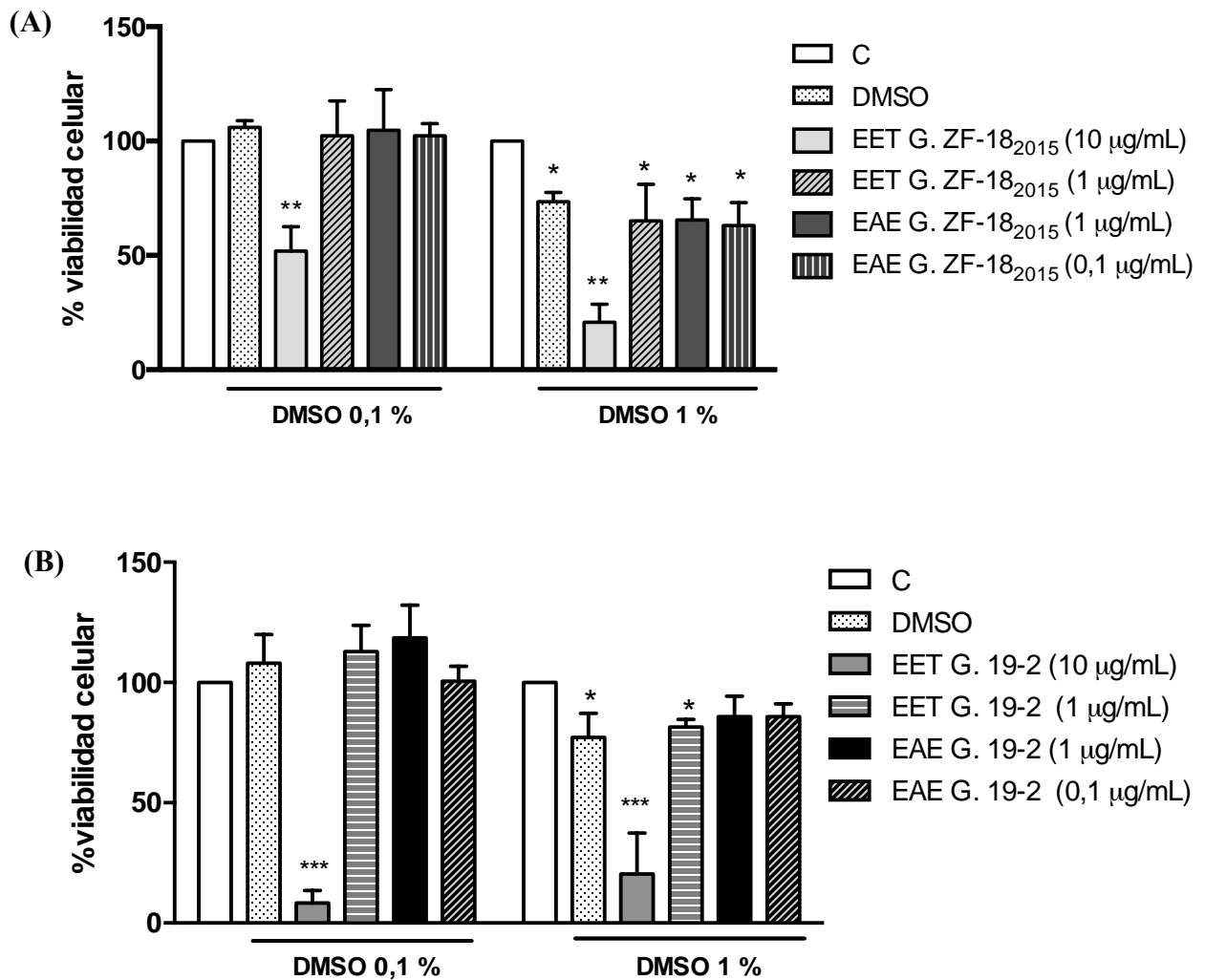


Figura 40. Viabilidad celular de los FDHs a las 72 h. Las células se trataron durante 72 h con los extractos a concentraciones de 1 y 10 µg/mL para los EETs y 0,1 y 1 µg/mL para los EAEs de cada genotipo, disueltos en DMSO al 0,1 y al 1% como concentración final. La viabilidad celular se evaluó mediante el ensayo de alamarBlue™ y el análisis estadístico se realizó mediante ANOVA de una vía seguido del test de Dunnett. * $p < 0,05$ y *** $p < 0,001$ respecto al control.

En segundo lugar, los EETs a la concentración de 10 µg/mL produjeron una significativa disminución de la viabilidad de los FDHs luego de 72 h de tratamiento, la cual fue alrededor de un 50% para el EET G. ZF-18₂₀₁₅ y de un 90% para el EET G. 19-2. Estos extractos, a 10 µg/mL, no fueron citotóxicos a las 24 h e incluso fueron capaces de incrementar la proliferación de

fibroblastos en presencia de SFB 10%, por lo que una posible respuesta a la citotoxicidad de los EETs a las 72 h podría estar relacionada al contenido de compuestos polifenólicos. D'Angelo et al. (2017) demostraron que un extracto de manzana rico en polifenoles fue capaz de producir lipoperoxidación en una línea celular de adenocarcinoma mamario a concentraciones altas, provocando una disminución significativa de la viabilidad celular luego de 48 h de tratamiento. Los autores concluyeron que el extracto, en el cual se identificaron polifenoles como quercetina, glucósidos de quercetina y catequina, aumentaba la producción de ERO intracelular a concentraciones altas, desencadenando arresto celular por *downregulation* de ciclina D1 y una disminución de la fosforilación de ERK1/2, lo que finalmente provocaba la muerte celular por apoptosis. Incluso, se ha demostrado que el medio de cultivo y/o los tampones fosfatos pueden influir en la producción de ERO al estar en contacto con polifenoles como quercetina, epicatequina galato (EGC), ácido gálico, entre otros. Por ejemplo, se ha demostrado que se generan mayores cantidades de H₂O₂ con ácido gálico y EGC en DMEM que en otros medios de cultivo (Babich et al., 2011) y que taninos derivados de ácido gálico a concentraciones mayores de 10 µM han resultado ser citotóxicos sobre células de moluscos debido a un efecto prooxidante que genera daño directo al ADN (Labieniec et al., 2003).

De acuerdo a lo anterior y considerando que los extractos no provocaron una muerte temprana de las células a las 24 h, es posible que los EETs hayan disminuido la viabilidad celular de los FDHs al desencadenar apoptosis por un efecto prooxidante. De todas formas, esta es una hipótesis que se debe comprobar mediante ensayos celulares que evalúen el efecto de los EETs sobre proteínas pro-apoptóticas a tiempos más tardíos. Por otro lado, de acuerdo con los resultados de viabilidad celular presentados, se escogió la concentración de 1 µg/mL en DMSO 0,1% para evaluar el efecto tanto de los EETs como de los EAes sobre la expresión de proteínas de MEC en los FDHs.

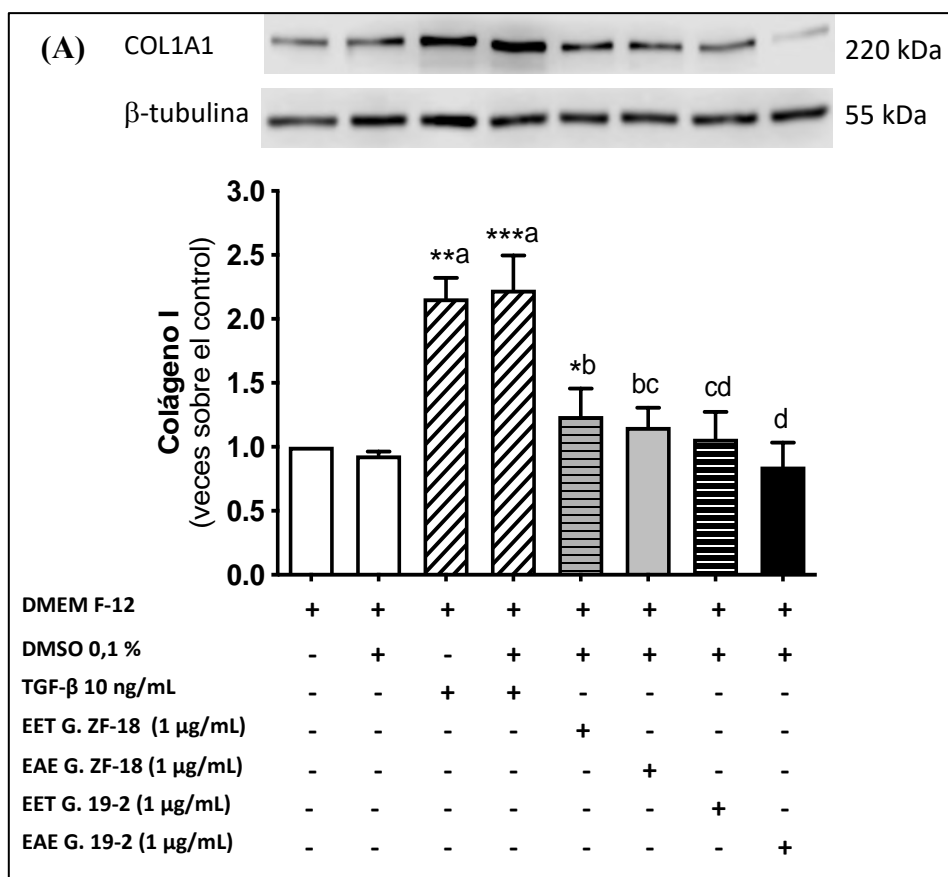
6.4.8. Expresión de proteínas de la matriz extracelular (MEC)

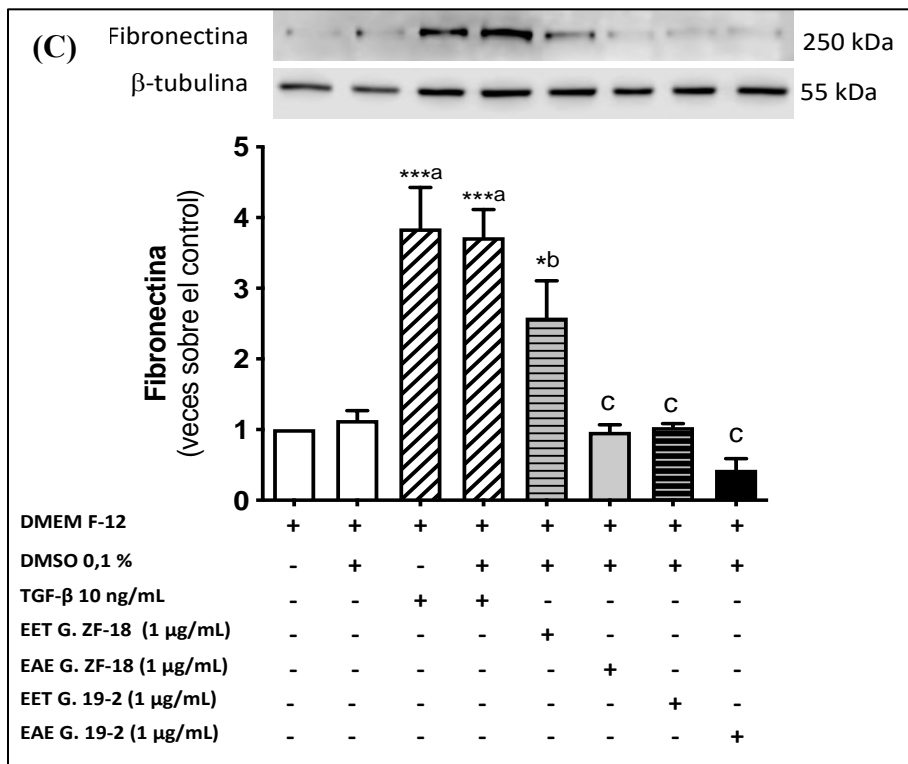
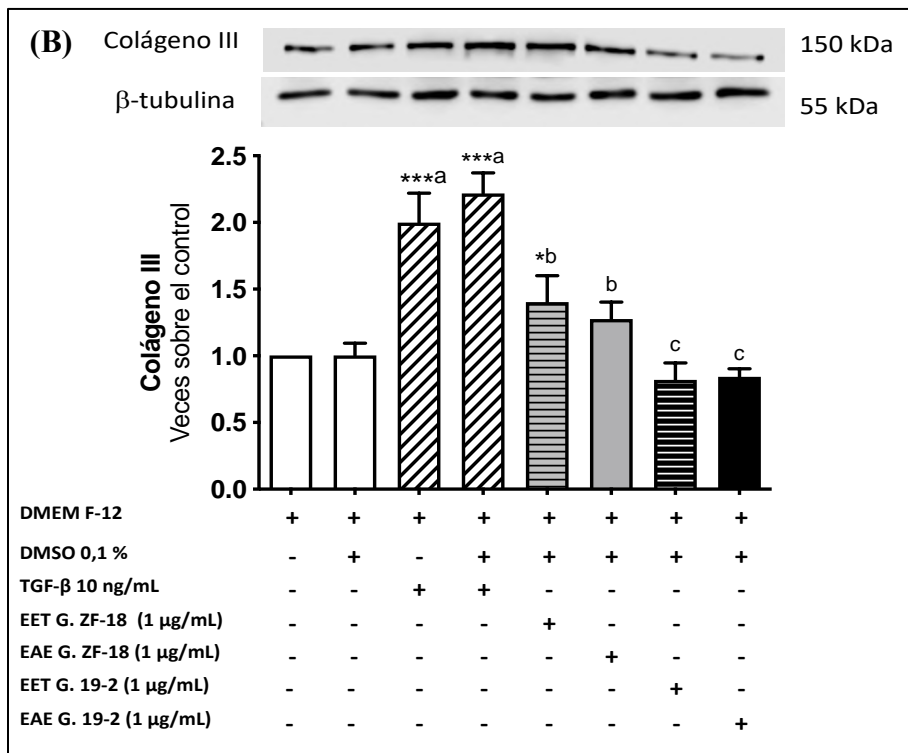
Los fibroblastos dérmicos, una vez que migran al sitio de la herida y luego de su posterior adhesión a la misma, comienzan a formar el tejido granuloso y a repoblar el tejido dañado con el fin de proveer una nueva matriz extracelular (MEC), cuya función es actuar como sitio de anclaje para la migración de fibroblastos y de otras células. Entre las principales proteínas de la MEC se encuentra colágeno tipo III, el cual es sintetizado en mayor cantidad durante las fases tempranas del proceso de cicatrización y que luego es reemplazado por colágeno tipo I, dando una mayor fuerza tensional a la cicatriz (Stunova y Vistejnova, 2018). Otra proteína importante durante este proceso es la fibronectina, la cual posee sitios de unión a colágeno de distintos tipos, a glicosaminoglicanos y a receptores de superficie como integrinas. Gracias a estas funciones, la fibronectina es una proteína clave para procesos celulares como proliferación, adhesión y migración (Lenselink et al., 2015).

En primer lugar, en la **Figura 41** se observa que el vehículo (DMSO 0,1 %) no presentó cambios estadísticamente significativos sobre los niveles de proteínas respecto a las células en ausencia del vehículo. En relación al efecto de los EETs y EAEs de las hojas de murtila, se obtuvieron resultados positivos con los extractos del G. ZF-18₂₀₁₅. En las Figuras **41-A** y **41-B** se observa un aumento tanto de procolágeno tipo I y tipo III en las células tratadas con el EET G. ZF-18₂₀₁₅ a la concentración de 1 µg/mL, el cual fue capaz de aumentar los niveles de estas proteínas entre 1,5 a 2 veces respecto a las células no tratadas. El EAE de este genotipo no obtuvo un valor estadísticamente significativo respecto al control; sin embargo, se observa una tendencia al aumento de estas proteínas y sus valores no obtuvieron diferencias significativas al compararlos con el EET. A pesar de ello, los niveles de incremento son inferiores al control positivo (TGF-β 10 ng/mL). Por otro lado, este resultado se correlaciona con un trabajo realizado en nuestro laboratorio previamente, donde se determinó que el EAE de las hojas de murtila silvestre aumentó el depósito de colágeno en FDHs, evaluado mediante inmunohistoquímica (Lobos A. 2006).

Cabe recordar que el EET G. ZF-18₂₀₁₅ se diferenció de los demás extractos debido a su alto contenido de fenoles y taninos totales, entre los que se encuentran ácidos fenólicos como ácido

quínico y ácido gálico y taninos hidrolizables derivados de ácido eláxico. Estos compuestos, que se encuentran en mayor proporción en el EET en comparación al EAE, podrían explicar el incremento de procolágeno I y colágeno III en las células tratadas con este extracto. Existe evidencia de que extractos acuosos ricos en taninos eláxicos son capaces de estimular la actividad de fibroblastos dérmicos, aumentando la proliferación y la síntesis de colágeno (Agyare et al., 2011). También se ha estudiado el efecto de taninos con residuos galoilos en su estructura, como epigalocatequina galato (EGCG) y epicatequina galato (ECG), sobre la estabilidad del colágeno. Jackson et al. (2019) demostraron que este tipo de taninos estabilizan la estructura de esta proteína gracias a las numerosas uniones mediante puentes de hidrógeno por los grupos galoilo, lo que conllevaría a una menor degradación del colágeno en presencia de colagenasa debido a que se impide que esta enzima actúe sobre los sitios de escisión de la proteína. Extractos etanólicos de *Calendula officinalis*, los cuales se caracterizan por contener flavonoides y saponinas, aumentan la síntesis de colágeno I en el sobrenadante de cultivos de fibroblastos dérmicos de una forma concentración dependiente (Nicolaus et al., 2017).





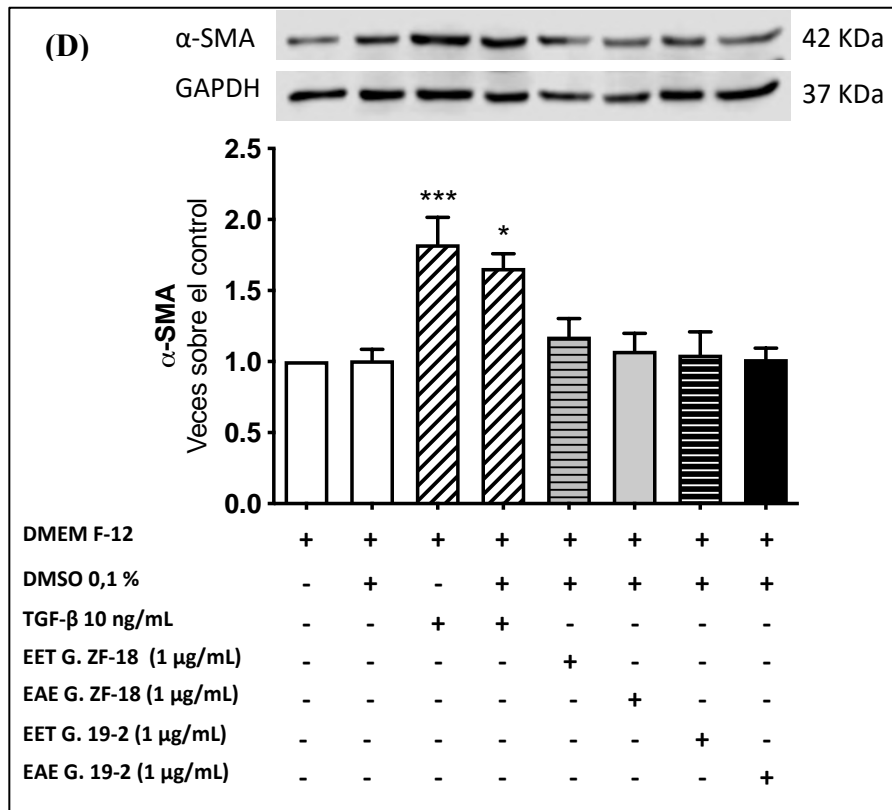


Figura 41. Niveles de expresión de proteínas de la matriz extracelular y diferenciación de fibroblasto a miofibroblasto a las 72 h. Los FDHs se trataron con los EETs y EAEs de los genotipos ZF-18 y 19-2 a una concentración de de 1 μ g/mL durante 72 h. Luego de este tiempo se midieron, a través de inmunodetección por western blot, los niveles de procolágeno I (A), colágeno III (B), fibronectina (C) y los niveles de α -SMA (D), un marcador de la diferenciación de fibroblasto a miofibroblasto. Los resultados se presentan como el promedio de cuatro experimentos independientes ($n=4$) \pm SEM. *** $p<0,001$; ** $p<0,01$; * $p<0,05$ vs control calculado con ANOVA de una vía y el test de Dunnett. ^{a,b,c,d}Letras diferentes en cada gráfico representan diferencias significativas respecto al resto de las muestras, calculado con ANOVA de una vía y el test de comparaciones múltiples de Tukey ($p<0,05$). El signo + indica la presencia de un tratamiento o reactivo; el signo - indica la ausencia de un tratamiento o reactivo. Control negativo: DMEM/F-12; control positivo: TGF- β 10 ng/mL; control del vehículo: DMSO 0,1%.

Respecto a los flavonoides, se ha demostrado que estos compuestos tienen un efecto sobre los niveles de colágeno tipo I y tipo III, aumentando su síntesis o inhibiendo metaloproteinasas de la matriz (MMPs), efecto que estaría asociado principalmente a la presencia de hidroxilos en las posiciones 3' y 4' del anillo B (Nazaruk y Galicka, 2014).

A pesar del estudiado efecto de TPCs como el ácido asiático, ácido madecásico, asiaticósido, entre otros, sobre el incremento en la síntesis de colágeno (Kikowska et al., 2018; Bylka et al., 2014; Lee et al., 2012), los EAEs de las hojas de murtila no aumentaron los niveles de esta proteína a las 72 h de forma significativa. Estos extractos se caracterizaron por concentrar en mayor proporción los TPCs; sin embargo, su principal efecto fue a nivel de adhesión celular y no sobre los niveles de proteínas de la matriz. Debido a que ambos EAEs poseen mayor concentración de TPCs respecto a los EETs, la tendencia de aumentar los niveles de procolágeno I y colágeno III del EAE G. ZF-18₂₀₁₅ podría explicarse principalmente por la cantidad de flavonoles presentes en el extracto, considerando que fue superior en alrededor de tres veces en comparación a la del EAE G. 19-2 (Peña-Cerda, 2016).

En la **Figura 41-C** se muestran los resultados de los niveles de fibronectina, siendo el EET G. ZF-18₂₀₁₅ el único extracto que produjo un aumento significativo de esta proteína luego de 72 h. Cabe destacar que a pesar de que el efecto fue inferior al obtenido por TGF- β 10 ng/mL, el incremento fue de alrededor 3,5 veces respecto al control. Existe poca evidencia en la literatura consultada que relacione el efecto de polifenoles o de extractos acuosos de especies vegetales con un aumento de los niveles de fibronectina; sin embargo, es importante resaltar que este resultado tiene gran relevancia para el proceso de cicatrización debido a que esta proteína tiene un rol crucial en la hemostasis. En esta etapa, la fibronectina otorga estabilidad al tapón de fibrina y luego, en la etapa proliferativa, participa en la formación y estabilidad de la MEC y en la interacción con diferentes tipos celulares y citocinas (Lenselink, 2013). Tampoco se encontró evidencia de un posible efecto cicatrizante de docosanol, el compuesto que se identificó solamente en el EET G. ZF-18₂₀₁₅, por lo que los resultados no se podrían asociar a su presencia en el extracto. Este compuesto se utiliza en la actualidad en pomadas al 10% para el tratamiento del herpes bucal (Treister y Woo, 2010).

Respecto a los extractos del G. 19-2, estos no presentaron diferencias significativas respecto al control del vehículo en ninguna de las proteínas de la MEC evaluadas, por lo que no afectaron los niveles de colágeno ni de fibronectina de los FDHs tratados con una concentración de 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$. Sin embargo, en la **Figura 41-A** se observa una tendencia a disminuir los niveles de procolágeno I en las células tratadas con el EAE G.19-2.

Por otro lado, en el proceso de cicatrización algunos de los fibroblastos presentes en el sitio de la herida se diferencian a miofibroblastos durante la fase proliferativa, principalmente por efecto de TGF- β . Estas células diferenciadas son capaces de contraer la herida debido a la producción de α -SMA, contribuyendo al cierre de ésta y a la secreción de mayores cantidades de proteínas de la MEC. Luego, los miofibroblastos mueren por apoptosis y son reemplazados por nuevos fibroblastos para continuar el proceso de remodelado (Stunova y Vistejnova, 2018). En relación a los niveles de α -SMA, estos no fueron afectados por ninguno de los extractos de las hojas de murtilla (**Figura 41-D**), por lo que el aumento de las proteínas de la MEC por parte del EET G. ZF-18₂₀₁₅ no se puede asociar a la diferenciación de fibroblastos a miofibroblastos. Estas células diferenciadas se han asociado a la formación de tejido fibrótico cuando persisten en el sitio de la herida por más del tiempo adecuado, generalmente por efecto de TGF- β y por estrés mecánico (Van De Water et al., 2013). El efecto de este extracto, por lo tanto, podría ser beneficioso para promover la cicatrización de heridas durante la fase proliferativa, donde se necesita un aumento en la síntesis de colágeno tipo III y de fibronectina por parte de los fibroblastos que migran al tejido dañado y, luego, durante la fase de remodelación donde aumenta la proporción de colágeno tipo I después de la apoptosis de los miofibroblastos. De acuerdo a esto, la aplicación *in vivo* del EET G. ZF-18₂₀₁₅ permitiría una cicatrización más controlada al no producir un aumento en la diferenciación de miofibroblastos, disminuyendo el riesgo de generar una cicatriz hipertrófica o queloide al no producir un aumento exacerbado de proteínas de la MEC.

6.4.9. Contracción de geles de colágeno

El ensayo de contracción de geles de colágeno es útil para evidenciar la verdadera presencia de miofibroblastos, puesto que estos al expresar α -SMA y al permitir su ensamblaje en las fibras de estrés, permite la correcta contracción de las heridas debido a la acción contráctil y sostenida que es llevada a cabo por las fibras de estrés presentes en el miofibroblasto. Esto permite la contracción de la MEC, promoviendo un cierre de la herida con mayor velocidad (Stunova y Vistejnova, 2018). En la **Figura 42** se evidencia que los extractos no fueron capaces de promover la contracción de los geles luego de 72 h, sin embargo, este resultado no es decisivo ya que no se pudo validar el ensayo con el control positivo (TGF- β 10 ng/mL).

Los extractos, de acuerdo con los resultados anteriores, no produjeron un aumento en los niveles de α -SMA, por lo que el hecho de no producir una contracción de los geles de colágeno estaría en concordancia con los resultados obtenidos por inmunodetección mediante Western blot (**Figura 41-D**).

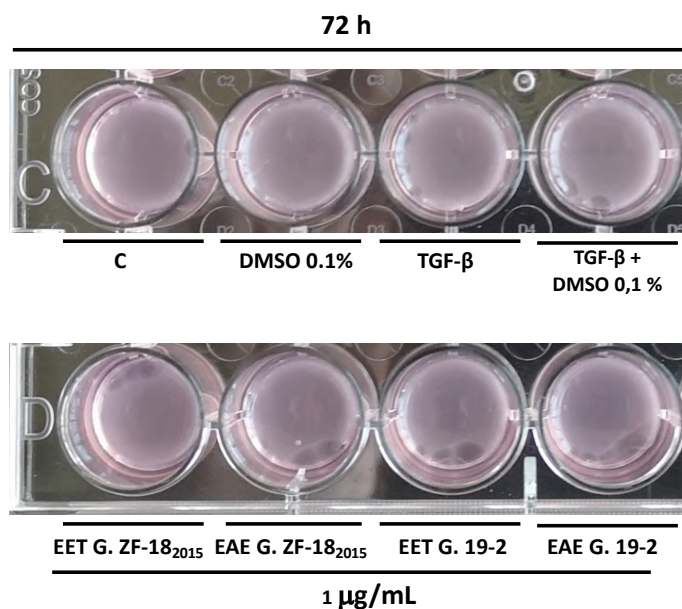


Figura 42. Contracción de geles de colágeno. Los FDHs se incubaron en un gel de colágeno durante 72 h con los EETs y EAEs de los genotipos ZF-18₂₀₁₅ y 19-2 a una concentración de 1 μ g/mL. Transcurrido este tiempo, se tomaron fotografías para evidenciar el efecto sobre la contracción del gel.

6.5. ESTUDIO COMPLEMENTARIO

EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA DE LOS EETs Y EAES DE LAS HOJAS DE MURTILLA DE DISTINTOS GENOTIPOS

6.5.1. Determinación de la concentración mínima inhibitoria (CIM)

Uno de los factores cruciales que perjudican el proceso de cicatrización es el desarrollo de infecciones en el sitio de la herida. En las heridas infectadas, la primera colonización se produce generalmente por bacterias Gram (+), como *Staphylococcus* spp. Posteriormente, se pueden encontrar microorganismos capaces de crecer en rangos de pH más altos, como *Pseudomona aeruginosa* y *Enterococcus faecalis* (Scalise et al., 2015). Debido a estos antecedentes, se determinó la concentración inhibitoria mínima (CIM) de los extractos seleccionados de hojas de murtila (grupos 1 y 2) sobre distintas cepas bacterianas que comúnmente infectan heridas de piel. De acuerdo a los resultados presentados en la **Tabla 14**, todos los EETs y EAES presentaron actividad antibacteriana frente a las cepas evaluadas, siendo más activos frente a *S. aureus* y MRSA (methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*). Los extractos del G. ZF-18₂₀₁₅ obtuvieron las menores CIM frente a ambas bacterias (32 µg/mL). Por otro lado, los extractos fueron menos activos frente a las bacterias GRAM (-) estudiadas, obteniendo valores de CIM entre 64-256 µg/mL. El EAE del G. 19-2 fue el extracto que presentó la mayor potencia frente a *E. coli*.

Tabla 14. Concentración inhibitoria mínima (CIM) de los EETs y EAES obtenidos de hojas de murtila de los genotipos ZF-18₂₀₁₅ y 19-2

Bacteria	CIM (µg/mL)				V	G
	EET ZF-18 ₂₀₁₅	EAE ZF-18 ₂₀₁₅	EET 19-2	EAE 19-2		
<i>S. aureus</i>	32	32	128	32	1	
MRSA	32	32	128	64	1	
<i>E. coli</i>	128	128	128	64		0,5
<i>P. aeruginosa</i>	128	128	128	256		0,25
<i>K. pneumoniae</i>	128	128	128	128		1

MRSA: Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*

V: Vancomicina

G: Gentamicina

Entre los agentes infecciosos más frecuentes identificados en aislamientos de heridas se encuentran: *Staphylococcus aureus* (37,50%), *Staphylococcus coagulasa* (-) (12,50%), *Escherichia coli* (10,05%), *Enterococcus faecalis* (7,42%), *Klebsiella pneumoniae* (5,08%) y *Staphylococcus epidermidis* (5,08%), entre otros (Otaíza et al., 2012). Respecto a esto, los compuestos fenólicos, principalmente flavonoles como los que se han identificado en los EETs de las hojas de murtilla, han demostrado tener un efecto antimicrobiano frente a distintas cepas bacterianas (Dzialo et al., 2016). Se ha concluido que su mecanismo de acción probablemente sea a través de la rigidización de la membrana lipídica de las bacterias (Wu et al., 2013).

En relación a los TPCs, se ha reportado que el ácido oleanólico posee una buena actividad antimicrobiana frente a *E. faecalis* (CIM: 8 µg/mL), *S. epidermidis* (CIM: 10 µg/mL) y una moderada actividad frente *S. Aureus* y MRSA (CIM: 64 µg/mL), igual al valor de CIM obtenido por el EAE del G. 19-2. El ácido ursólico, por su lado, posee una moderada actividad frente a *E. coli* (CIM: 50 µg/mL) (Wolska et al., 2010). Unos de los mecanismos de acción propuestos para el efecto antibacteriano de estos TPCs es que poseen la capacidad de perturbar la organización de los dominios ricos en cardiolipinas de la membrana bacteriana y, también, que afectan su fluidez a través de la interacción con moléculas de fosfatidilglicerol (Broniatowski et al., 2014).

Los resultados de actividad antibacteriana exhibidos por los EETs y EAEs de las hojas de murtilla podrían promover una mejor cicatrización de heridas con complicaciones, como heridas crónicas del pie diabético, lo cual mejoraría el curso de este proceso en conjunto con los efectos observados sobre los FDHs.

VII. RESUMEN DE LOS RESULTADOS DEL EFECTO DE LOS EETs y EAES SELECCIONADOS SOBRE FUNCIONES DE FIBROBLASTOS DÉRMICOS HUMANOS ASOCIADAS A CICATRIZACIÓN

Tabla 15. Resumen de la viabilidad de los fibroblastos dérmicos humanos tratados por 24 h con los EETs y EAES de las hojas de murtila de los genotipos ZF-18₂₀₁₅ y 19-2

	Ensayo	Grupo 1 (EETs seleccionados por diferencias en el contenido de polifenoles)		Grupo 2 (EAES seleccionados por diferencias en el contenido de triterpenos)	
		EET G. ZF-18 ₂₀₁₅	EET G. 19-2	EAE G. ZF-18 ₂₀₁₅	EAE G. 19-2
Concentración no citotóxica (µg/mL)	Azul de tripán	≤10	≤ 10	≤ 1	≤ 1
	alamarBlue™	≤ 25	≤ 10	≤ 5	≤ 1
CL₅₀ (µg/mL)	Azul de tripán	22,9 ± 2,5	23,8 ± 2,0	8,1 ± 2,6	9,5 ± 1,7
	alamarBlue™	76,6 ± 4,9	18,6 ± 3,8	14,0 ± 3,7	3,2 ± 0,7

EET: Extracto acetato de etilo. EAE: Extracto etanólico. G: Genotipo. CL₅₀: Concentración letal 50

Tabla 16. Resumen de los resultados obtenidos por los EETs y EAEs de los genotipos ZF-18₂₀₁₅ y 19-2 sobre distintas funciones de fibroblastos dérmicos humanos asociadas a cicatrización

Ensayo		Grupo 1 (EETs seleccionados por diferencias en el contenido de polifenoles)		Grupo 2 (EAEs seleccionados por diferencias en el contenido de triterpenos)	
		EET G. ZF-18 ₂₀₁₅	EET G. 19-2	EAE G. ZF-18 ₂₀₁₅	EAE G. 19-2
Proliferación celular	Sin SFB	✓	-	-	-
	SFB 1%	-	-	-	-
	SFB 10%	✓	✓	-	-
Adhesión celular		-	✓	✓✓	✓
Migración celular		✓	✓	✓	✓
Niveles de procolágeno I		✓	-	-	-
Niveles de colágeno III		✓	-	-	-
Niveles de fibronectina		✓✓	-	-	-
Niveles de α -SMA		-	-	-	-

EET : Extracto acetato de etilo. EAE : Extracto etanólico. G: Genotipo . ✓: Efecto positivo de los extractos de hojas de murtila sobre la proliferación, adhesión o migración celular de FDHs. - : Sin efecto cuantificable

VIII. CONCLUSIONES

1. Selección de EETs y EAES de distintos genotipos de hojas de murtila (2013) diferenciados por su composición química

Los genotipos de murtila presentan diferencias estadísticamente significativas en su contenido de fenoles y taninos totales (CFT y CTT, respectivamente), siendo los EETs quienes concentran en mayor proporción estos compuestos y los EAES quienes presentan mayor concentración de triterpenos pentacíclicos (TCPs).

El EET del G. ZF-18₂₀₁₅ presenta el mayor CFT y CTT y el EET G. 19-2 el menor contenido.

El EAE del G.19-2 posee el mayor contenido de ácido asiático, ácido corosólico y la mezcla de los ácidos ursólico y oleanólico respecto del EAE G. ZF-18.

2. Caracterización química y actividad antioxidante de los nuevos extractos seriados (EET y EAE) del G. ZF-18 de hojas recolectadas en el año 2015 (genotipo seleccionado por presentar la mayor cantidad de polifenoles)

El año de recolección no afecta de forma significativa la cantidad de fenoles totales ni de taninos totales del EET y EAE de las hojas del G. ZF-18₂₀₁₅, pero sí afecta el contenido de flavonoides. Esta diferencia en el contenido de flavonoides se correlaciona con la actividad antioxidante, la cual fue mayor en el EAE G. ZF-18₂₀₁₅ en comparación al EAE G. ZF-18₂₀₁₃.

Mediante el análisis por derreplicación y con la formación de redes moleculares, se concluye que tanto el EET como el EAE del G. ZF-18₂₀₁₅ presentan principalmente compuestos relacionados a familias de heterósidos flavónicos, flavonoles, flavan-3-oles y taninos elágicos. Otros compuestos identificados corresponden a ácidos fenólicos y derivados de ácido gálico, los cuales se encuentran principalmente en el EET.

Entre los nuevos compuestos identificados en el EET y EAE de las hojas del G. ZF-18₂₀₁₅ se encuentran polifenoles como miricetina-3-O-beta-D-galactosido-6"-O-galato, isoramnetina-3-O-rutinósido, avicularina, hiperósido y gosipetina, un alcohol alifático (docosanol) y un disacárido (trehalosa).

3. Efecto de los EETs y EAES de los genotipos ZF-18₂₀₁₅ y 19-2 sobre funciones de fibroblastos dérmicos humanos (FDHs) asociadas a cicatrización

Los EETs de ambos genotipos seleccionados son menos citotóxicos para los FDHs que los EAES y aumentan la proliferación celular a 10 ug/mL y la migración celular a 1 ug/mL a las 24 h.

El EAE G. ZF-18₂₀₁₅, el cual tiene una mezcla de TPCs y de compuestos fenólicos (flavonoides principalmente), aumenta la adhesión de los FDHs a las 24 h.

El EET G. ZF-18₂₀₁₅ a 1 ug/mL incrementa los niveles de procolágeno I, colágeno III y de fibronectina. Estos resultados podrían estar relacionados a los compuestos fenólicos presentes en este extracto.

Ninguno de los extractos tiene un efecto sobre los niveles de α -SMA, por lo que los EETs y EAES de los genotipos ZF-18₂₀₁₅ y 19-2 no promueven la diferenciación de fibroblastos a miofibroblastos.

Los extractos con mayor proyección para posteriores estudios *in vivo* de cicatrización corresponden al EET y EAE de las hojas de murtila del G. ZF-18, los cuales podrían favorecer el proceso de reparación cutánea mediante la activación de fibroblastos dérmicos.

4. Estudio complementario: actividad antibacteriana

Los EETs y EAEs de los genotipos 19-2 y ZF-18₂₀₁₅ de murtila presentan actividad antimicrobiana frente a bacterias que comúnmente infectan heridas de piel, siendo más activos frente a GRAM (+). Particularmente, el EET y el EAE del G. ZF-18₂₀₁₅ presentan mayor potencia frente a *S. aureus* y MRSA, mientras que el EAE del G. 19-2 es más potente frente a *E. coli* (GRAM -).

IX. REFERENCIAS

- Aburto I. y Morgado P. 2012. Gestión en manejo de heridas y úlceras en Chile. *Revista Chilena de Heridas y Ostomías* 1(1):7-12.
- Adamczyk B., Simon J., Kitunen V., Adamczyk S., Smolander A. 2017. Tannins and their complex interaction with different organic nitrogen compounds and enzymes: old paradigms versus recent advances. *Chemistry Open* 16;6(5):610-614.
- Aguirre M.C. 2007. Aislamiento e identificación de los principios activos anti-inflamatorios y antioxidantes de las hojas de *Ugni molinae* Turcz. (Murtilla) Myrtaceae. Obtención de un extracto estandarizado. Tesis entregada a la Universidad de Chile para optar al grado de Doctor en Ciencias Farmacéuticas. Santiago, Chile.
- Aguirre M.C., Delporte C., Backhouse N., Eraz S., Letelier ME., Cassels BK., Silva X., Alegría S., Negrete R. 2006. Topical anti-inflammatory activity of 2 α -hydroxy pentacyclic triterpene acids from the leaves of *Ugni molinae*. *Bioorganic & Medicinal Chemistry* 14 (16):5673-5677.
- Agyare C., Lechtenberg M., Deters A., Petereit F., Hensel A. 2011. Ellagitannins from *Phyllanthus muellerianus* (Kuntze) Exell: Geraniin and furososin stimulate cellular activity, differentiation and collagen synthesis of human skin keratinocytes and dermal fibroblasts. *Phytomedicine* 15; 18(7):617-24
- Arancibia-Radich J., Peña-Cerda M., Jara D., Valenzuela-Bustamante P., Goity L., Valenzuela-Barra G., Silva X., Garrido G., Delporte C., Seguel I. 2016. Comparative study of anti-inflammatory activity and qualitative-quantitative composition of triterpenoids from ten genotypes of *Ugni molinae*. *Boletín Latinoamericano y del Caribe de Plantas Medicinales y Aromáticas* 15 (5): 274 - 287
- Avello M., Valdivia R., Mondaca M., Ordoñez J., Bittner M., Becerra J. 2009a. 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.
- Avello M., Valdivia R., Sanzana R., Mondaca M.A., Mennickent S., Aeschlimann V., Bittner M., Becerra J. 2009b. Extractos antioxidantes y antimicrobianos de *Aristotelia chilensis* y *Ugni molinae* y sus aplicaciones como preservantes en productos cosméticos. *Boletín Latinoamericano y del Caribe de Plantas Medicinales Aromáticas* 8: 479 - 486.
- Avello, M., Pastene, E., González, M., Bittner, M., Becerra, J. 2013. In vitro determination of the antioxidant capacity of extracts and phenolic compounds from *Ugni molinae* Turcz. leaves. *Boletín latinoamericano y del Caribe de plantas medicinales y aromáticas (BLACPMA)*. 18(4), 596-608.

Babich H, Schuck AG., Weisburg JH., Zuckerbraun H. 2011. Research strategies in the study of the pro-oxidant nature of polyphenol nutraceuticals. *Journal of Toxicology* ID 467305.

Benzie I. y Strain J. 1996. The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of antioxidant power: The FRAP assay. *Analytical biochemistry* 239, 70-76.

Boilly B., Vercoutter-Edouart A.S., Hondermarck H., Nurcombe V., Le Bourhis X., 2000. FGF signals for cell proliferation and migration through different pathways. *Cytokine Growth Factor Rev.* 11, 295–302.

Broniatowski M., Flasiński M., Zieba K., Miskowicz P. 2014. Interactions of pentacyclic triterpene acids with cardiolipins and related phosphatidylglycerols in model systems. *Biochimica et Biophysica Acta* 1838(10):2530–2538.

Bonte F., Dumas M., Chaudagne C., Meybeck A. 1994. Influence of asiatic acid, madecassic acid, and asiaticoside on human collagen I synthesis. *Planta Medica* 60:133-35.

Both D.M., Goodtzova K., Yarosh D.B., Brown D.A. 2002. Liposome encapsulated ursolic acid increases ceramides and collagen in human skin cells. *Archives of Dermatological Research* 293(11):569–575.

Bugueño I., Arancibia-Radich J., Peña-Cerda M., Cortez G., Seguel I., Delporte C. 2015. Comparative study of inhibitory activity of the protein tyrosine phosphatase 1B of *Ugni molinae* leaves genotypes. En: Congreso en conjunto entre las sociedades chilenas de farmacología, Ciencias Fisiológicas y Neurociencia: 2-25 de Septiembre, Coquimbo, IV Región, Chile

Bylka W., Znajdek-Awizeń P., Studzińska-Sroka E., Dańczak-Pazdrowska A., Brzezińska M.. 2014. *Centella asiatica* in dermatology: an overview. *Phytotherapy Research* 28(8):1117-24.

Cao Y. Fang S. Fu X. Shang X. Yang W. 2019. Seasonal Variation in Phenolic Compounds and Antioxidant Activity in Leaves of *Cyclocarya paliurus* (Batal.) Iljinskaja. *Forests* 10, 624.

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

Chokotho L. and van Hasselt E. 2005. The use of tannins in the local treatment of burn wounds - a pilot study. *Malawi Medical Journal* 17(1):19-20.

Chua I., King P., Ong K., Sarbini S., Yiu P. 2015. Influence of light intensity and temperature on antioxidant activity in *Premna serratifolia* L. *Journal of soil science and plant nutrition* 15(3), 605-614.

Chudzik M., Korzonek-Szlacheta I., Król, W. 2015. Triterpenes as Potentially Cytotoxic Compounds. *Molecules* 20:1610-1625.

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

CLSI. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing. 2019. 29th ed. CLSI supplement M100. Wayne, PA. Clinical and Laboratory Standards Institute.

Coldren CD, Hashim P, Ali JM, Oh SK, Sinskey AJ, Rha C. 2003. Gene expression changes in the human fibroblast induced by *Centella asiatica* triterpenoids. *Planta Medica* 69: 725–732.

D'Angelo S., Martino E., Ilisso C.P., Bagarolo M.L., Porcelli M., Cacciapuoti, G. 2017. Pro-oxidant and pro-apoptotic activity of polyphenol extract from Annurca apple and its underlying mechanisms in human breast cancer cells. *International Journal of Oncology* 51, 939-948.

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

Dinda M., Mazumdar S., Das S., Ganguly D., Dasgupta UB., Dutta A., Jana K., Karmakar P. 2016. The water fraction of *Calendula officinalis* hydroethanol extract stimulates in vitro and in vivo proliferation of dermal fibroblasts in wound healing. *Phytotherapy Research* 30(10):1696-1707.

Doll U., Rodríguez I., Soto C., Razmilic I. 2012. Propagación de estacas y concentración de taninos y flavonoides en hojas de dos procedencias de *Ugni molinae* de la región del Maule (Chile). *BOSQUE* 33(2): 203-209.

Dzialo M., Mierziak J., Korzun U., Preisner M., Szopa J., Kulma A. 2016. The Potential of Plant Phenolics in Prevention and Therapy of Skin Disorders. *International Journal of Molecular Sciences* 17(2):1-41.

Enoch S., Leaper D.L. 2005. Basic science of wound healing. *Surgery* 23(2): 37-42.

Faghihi G. y Radan M. 2011. Side effects of herbal drugs used in dermatologic disorders. *Journal of Cosmetics, Dermatological Sciences and Applications* 1:1-3.

Fernández O., Béthencourt L., Quero A., Sangwan RS., Clément C. 2010. Trehalose and plant stress responses: friend or foe?. *Trends in Plant Science* 2;15(7):409-17

Fronza M., Heinzmann B., Hamburger M., Laufer S., Merfort I. 2009. Determination of the wound healing effect of *Calendula* extracts using the scratch assay with 3T3 fibroblasts. *Journal of Ethnopharmacology* 10;126(3):463-7.

Furtado N., Pirson L., Edelberg H., Miranda L., Loira-Pastoriza C., Preat V., Larondelle Y., André C. M. 2017. Pentacyclic triterpene bioavailability: an overview of In vitro and in vivo studies. *Molecules* 22(3):400.

Galanakis C.M., Goulas V., Tsakona S., Manganaris G.A., Gekas V. 2013. A knowledge base for the recovery of natural phenols with different solvents. *International Journal of Food Properties* 16, 382–396.

Göity L., Queupil M.J., Jara D., Alegría S., Peña M., Barriga A., Aguirre M.C., Delporte C. 2013. 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 (BLACPMA)* 12 (1), 108-116.

Goo H.C., Hwang Y-S., Choi Y.R., Cho H.N., Suh H. 2003. Development of collagenase-resistant collagen and its interaction with adult human dermal fibroblasts. *Biomaterials* 24:5099–5113.

Harishkumar M., Masatoshi Y., Hiroshi S., Tsuyomu I., Masugi M. 2013. Revealing the mechanism of in vitro wound healing properties of *Citrus tamurana* extract. *BioMed Research International* 2013:963457.

Harper D., Young A., McNaught C-E. 2014. The physiology of wound healing. *Surgery (Oxford)* 32(9):445-450.

Hashim P, Sidek H, Helan MH, Sabery A, Palanisamy UD, Ilham M. 2011. Triterpene composition and bioactivities of *Centella asiatica*. *Molecules* 16(2):1310–22.

Hauser C., Peñaloza A., Rodríguez F., Guarda A., Galotto M.J. 2014. 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.

Henríquez C., Almonacid S., Chiffelle I., Valenzuela T., Araya M., Cabezas L., Simpson R., Speisky H. 2010. Determination of antioxidant capacity, total phenolic content and mineral composition of

different fruit tissue of five apple cultivars grown in Chile. *Chilean Journal of Agricultural Research* 70(4), 523-536.

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

Imatomi M., Novaes O., Matos A., Gualtieri J., et al., 2013. Phytotoxic effect of bioactive compounds isolated from *Myrcia tomentosa* (Myrtaceae) leaves. *Biochemical Systematics and Ecology* 46: 29–35

Jackson J.K., Zhao J., Wong W., Burt H.M. 2010. The inhibition of collagenase induced degradation of collagen by the galloyl-containing polyphenols tannic acid, epigallocatechin gallate and epicatechin gallate. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine* 21(5):1435-43.

Jara-Moreno D., Castro-Torres R., Ettcheto M., Auladell C., Kogan M.J., Folch J., Verdaguer E., Cano A., Busquets O., Delporte C., Camins A. 2018. The ethyl acetate extract of leaves of *Ugni molinae* Turcz. improves neuropathological hallmarks of Alzheimer's disease in female APP^{swe}/PS1dE9 mice fed with a high fat diet. *Journal of Alzheimer's Disease* 66(3):1175-1191.

Jara-Moreno D., Riveros A., Barriga A., Kogan M.J., Delporte C. 2020. Inhibition of β -amyloid Aggregation of *Ugni Molinae* Extracts. *Current Pharmaceutical Design* 26:1.

Jeganathan B., Punyasiri P.A., Kottawa-Arachchi J.D., Ranatunga M.A., Abeysinghe I.S., Gunasekare M.T., Bandara B.M. 2016. Genetic variation of flavonols quercetin, myricetin and kaempferol in the Sri Lankan Tea (*Camellia sinensis* L.) and their health-promoting aspects. *International Journal of Food Science* 2016:6057434.

Jie-Ping F., Tao K., Lu Z., Sheng T., Zhe-You T., Yong-Hua D., Xue-Hong Z. 2011. Solubilities of ursolic acid and oleanolic acid in four solvents from (283.2 to 329.7) K. *Journal of Chemical & Engineering Data* 56(5), 2723-2725.

Kikowska M. A., Chmielewska M., Włodarczyk A., Studzińska-Sroka E., Żuchowski J., Stochmal, A. 2018. Effect of pentacyclic triterpenoids-tich callus extract of *Chaenomeles japonica* (Thunb.) Lindl. ex Spach on viability, morphology and proliferation of normal human skin fibroblasts. *Molecules* 23(11), 3009.

Kon K. y Rai M. 2014. *Microbiology for Surgical Infections: Diagnosis, Prognosis and Treatment*, USA, Elsevier Inc. 187-203pp.

Ku S.H., Ryu J., Hong S.K., Lee H., Park C.B. 2010. General functionalization route for cell adhesion on non-wetting surfaces. *Biomaterial* 31(9):2535-41

Kuonen R., Weissenstein U., Urech K., Kunz M., Hostanska K., Estko M., Heusser P., Baumgartner S. 2013. Effects of lipophilic extract of *Viscum album* L. and oleanolic acid on migratory activity of NIH/3T3 fibroblasts and on HaCat keratinocytes. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine* 2013:718105.

Lai J.C, Lai H.Y, Nalamolu K.R, Ng S.F. 2016. Treatment for diabetic ulcer wounds using a fern tannin optimized hydrogel formulation with antibacterial and antioxidative properties. *Journal of Ethnopharmacology* 189:277–289.

Leal A., Layne H., da Silva D., Nunes L., Arimateia J. 2015. Incorporation of tannic acid in formulations for topical use in wound healing: A technological prospecting. *African Journal of Pharmacy and Pharmacology* 9. 662-674.

Lee C., Kim S-H., Jang J.H., Lee S-Y. 2017. Enhanced cell adhesion on a nano-embossed, sticky surface prepared by the printing of a DOPA-bolaamphiphile assembly ink. *Scientific reports* 7 (1): 13797.

Lee J.H., Kim H.L., Lee M.H., You K.E., Kwon B.J., Seo H.J., Park J.C. 2012. Asiaticoside enhances normal human skin cell migration, attachment and growth in vitro wound healing model. *Phytomedicine* 19:1223–1227.

Lenselink E.A. 2015. Role of fibronectin in normal wound healing. *International Wound Journal* 12: 313-316.

Li W., Fan J., Chen M., Guan S., Sawcer D., Bokoch G.M., Woodley D.T. 2004. Mechanism of human dermal fibroblast migration driven by type I collagen and platelet-derived growth factor-BB. *Molecular Biology of the Cell* 15(1):294-309.

Lobos A. 2006. Evaluación de la actividad cicatrizante de *Ugni Molinae* Turcz., Myrtaceae (murtilla) mediante ensayos de proliferación, depósito de proteínas de matriz extracelular y migración de fibroblastos de piel humana. Memoria para optar al título de Químico Farmacéutico, Universidad de Chile.

Maquart F.X., Bellon G., Gillery P., Wegrowski Y., Borel J.P. 1990. Stimulation of collagen synthesis in fibroblast cultures by a triterpene extracted from *Centella asiatica*. *Connective Tissue Research* 24:107–20

Ministerio del Ambiente. 2016. Informe del estado del medio ambiente. Gobierno de Chile.

Moghadam SE., Ebrahimi SN., Salehi P., Moridi Farimani M., Hamburger M., Jabbarzadeh E. 2017. Wound healing potential of chlorogenic acid and myricetin-3-O- β -rhamnoside isolated from *Parrotia persica*. *Molecules* 8;22(9).

Montenegro G. 2002. Chile, nuestra flora útil. Guía de plantas de uso apícola, en medicina folclórica, artesanal y ornamental. 2° Ed. Santiago de Chile, Ediciones Universidad Católica de Chile. 241-242pp.

Moskot M., Jakóbkiewicz-Banecka J., Kloska A., Smolińska E., Mozolewski P., Malinowska M., Rychłowski M., Banecki B. Węgrzyn G., Gabig-Cimińska M. 2015. Modulation of expression of genes involved in glycosaminoglycan metabolism and lysosome biogenesis by flavonoids. *Scientific Reports* 5: 9378.

Morton L.M, Phillips T.J. 2016. Wound healing and treating wounds: Differential diagnosis and evaluation of chronic wounds. *Journal of American Academy of Dermatology* 74(4):589-606.

Moura-Letts G., Villegas L.F., Marcalo A., Vaisberg A.J., Hammond G.B. 2006. In vivo wound-healing activity of oleanolic acid derived from the acid hydrolysis of *Anredera diffusa*. *Journal of Natural Products* 69:978–979

National Center for Biotechnology Information. 2020. PubChem Compound Summary for CID 122738, Procyanidin B2. Recuperado el 13 de septiembre, 2020 desde <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Procyanidin-B2>.

Nazaruk J. y Galicka A. 2014. The influence of selected flavonoids from the leaves of *Cirsium palustre* (L.) Scop. on collagen expression in human skin fibroblasts. *Phytotherapy Research* (9):1399-405.

Nicolaus C., Junghanns S., Hartmann A., Murillo R., Ganzera M., Merfort I. 2017. In vitro studies to evaluate the wound healing properties of *Calendula officinalis* extracts. *Journal of Ethnopharmacology* 196:94-103.

Opneja A., Kapoor S., Stavrou EX., Contribution of platelets, the coagulation and fibrinolytic systems to cutaneous wound healing. 2019. *Thrombosis Research* 79:56-63.

Otaíza F., Bustamante R., Sánchez P. 2012. Informe de vigilancia de infecciones asociadas a las atenciones de salud. Ministerio de Salud, Santiago, Chile.

Palhares R.M., Gonçalves M., dos Santos Alves F.B., Pereira Cosenza G., das Graças L.B., Oliveira G. 2015. Medicinal plants recommended by the world health organization: DNA barcode identification associated with chemical analyses guarantees their quality. *PLoS ONE* 10(5):e0127866.

Parkar H., Aiyegoro OA., Steenkamp P., Steenkamp V. 2017. Extracts of *Terminalia sericea* enhance cell migratory activity of endothelial hybrid and fibroblast cells in vitro. *Planta Medica* 83(18):1397-1404

Peña-Cerda M. 2016. Estudio comparativo de la composición química y actividad antioxidante de hojas de distintos genotipos de *Ugni molinae*. Estudio del mecanismo antiinflamatorio de uno de los extractos bioactivos. Tesis para optar al grado de Doctor en Ciencias Farmacéuticas, Universidad de Chile, Santiago.

Peña-Cerda M., Arancibia-Radich J., Valenzuela-Bustamante P., Pérez-Arancibia R., Barriga A., Seguel I., García L., Delporte C. 2017. Phenolic composition and antioxidant capacity of *Ugni molinae* Turcz. leaves of different genotypes. *Food Chemistry* 215:219–227.

Qing C. The molecular biology in wound healing & non-healing wound. 2019. *Chinese Journal of Traumatology* 20, 189–193.

Queupil M.J. Actividad inhibitoria de glicógeno fosforilasa a de los extractos obtenidos desde las hojas de *Ugni molinae* Turcz. (Murtilla), Myrtaceae. Identificación de los principios activos. Memoria para optar al título de Químico Farmacéutico, Universidad de Chile. 2011.

Rampersad, S.N. 2012. Multiple applications of alamar blue as an indicator of metabolic function and cellular health in cell viability bioassays. *Sensors* 12, 12347–12360.

Rittié L., Fisher G.J. 2005. Isolation and culture of skin fibroblasts. *Methods in Molecular Medicine* 117: 83–98

Rivera J. (28 de julio de 2019). Parche con plantas nativas ayuda a cicatrizar en tiempo récord. *Las Últimas Noticias*, pp15.

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

Rubilar M., Pinelo M., Ihl M., Scheuermann E., Sineiro J., Nuñez M.J. 2006. Murta leaves (*Ugni molinae* Turcz) as a source of antioxidant polyphenols. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 54, 59-64.

Sampaio B., Bara M., Ferri P., Santos S., Paula J.R. De. 2011. Influence of environmental factors on the concentration of phenolic compounds in leaves of *Lafoensia pacari*. *Revista Brasileira de Farmacognosia* 21(6):1127-1137.

Santos-Sánchez N., Salas-Coronado R., Villanueva-Cañongo C., Hernández-Carlos B. 2019. Antioxidant compounds and their antioxidant mechanism, antioxidants, emad Shalaby, IntechOpen.

Sanon S., Hart D.A., Tredget E.E. 2016. Molecular and cellular biology of wound healing and skin regeneration. En: Albanna M., Holmes J.H. (Eds). Skin Tissue Engineering and Regenerative Medicine. USA, Elsevier Inc. 19–47pp.

Scalise A., Bianchi A., Tartaglione C., Bolletta E., Pierangeli M., Torresetti M., Marazzi M., Di Benedetto G. 2015. Microenvironment and microbiology of skin wounds: the role of bacterial biofilms and related factors. *Seminars in Vascular Surgery* 28(3-4):151-159.

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

Seguel I., Torralbo L., Schuermann E. 2015. Murtilla: De berry silvestre a cultivado y de Chile al mundo. *Redagícola* 75: 42.

Shinde A., Humeres C., Frangogiannis N. 2017. The role of α -smooth muscle actin in fibroblast-mediated matrix contraction and remodeling. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Basis of Disease* 1863(1):298-309

Shene C., Reyes A., Villarroel M., Sineiro J., Pinelo M., Rubilar M. 2009. Plant location and extraction procedure strongly alter the antimicrobial activity of murta extracts. *European Food Research and Technology* 228:467–475.

Shene C., Canquil N., Jorquera M., Pinelo M., Rubilar M., Acevedo F., Vergara C., von Baer D., Mardones C. 2012. In vitro activity on human gut bacteria of murta leaf extracts (*Ugni molinae* Turcz.), a native plant from southern Chile. *Journal of Food Science* 77(6): 323-329.

Shenefelt PD. 2011. Herbal treatment of dermatologic disorders. En Benzie FI., Wachtel-Galor S. *Herbal Medicine: biomolecular and clinical aspects*. 2ª Ed., Estados Unidos, 383-399pp.

Somboonwong J., Kankaisre M., Tantisira B. Tantisira M. 2012. Wound healing activities of different extracts of *Centella asiatica* in incision and burn wound models: an experimental animal study. *BMC Complementary and Alternative Medicine* 12:103.

Stunova A. y Vistejnova L. 2018. Dermal fibroblasts - A heterogeneous population with regulatory function in wound healing. *Cytokine Growth Factor Reviews* 39:137-150

Strober W. 2001. Trypan blue exclusion test of cell viability. *Current Protocols in Immunology* 21:3B:A.3B.1–A.3B.2.

Tafolla-Arellano J.C., González-León A., Tiznado-Hernández M, García L., Báez-Sañudo R. 201., Composición, fisiología y biosíntesis de la cutícula en plantas. *Revista Fitotecnia Mexicana* 36(1):3-12.

Thakur R., Jain N., Pathak R., Sandhu S.S. 2011. Practices in wound healing studies of plants. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine* 438056: 1-17.

Tan H., Sonam T., Shimizu K. 2017. The potential of triterpenoids from loquat leaves (*Eriobotrya japonica*) for prevention and treatment of skin disorder. *International Journal of Molecular Sciences* 18(5), 1030.

Teller P., White T.K. 2009. The Physiology of Wound Healing: Injury Through Maturation. *Surgical Clinics of North America* 89:599–610.

Torres A., Seguel I., Contreras G., Castro M., 1999. Caracterización físico - química de frutos de murtila *Ugni molinae* Turcz. *Agricultura Técnica (Chile)* 59 (4): 260-270.

Torri M.C. 2010. Medicinal plants used in Mapuche Traditional Medicine in Araucanía, Chile: linking sociocultural and religious values with local health practices. *Complementary Health Practice Review* 15(3), 132–148.

Treister N.S. y Woo S.B. 2010. Topical n-docosanol for management of recurrent herpes labialis. *Expert Opinion Pharmacotherapy* 11(5):853-60.

Van De Water L, Varney S, Tomasek JJ. Mechanoregulation of the Myofibroblast in Wound Contraction, Scarring, and Fibrosis: Opportunities for New Therapeutic Intervention. 2013. *Advances in Wound Care* 2(4):122-141.

Veas R., Arancibia-Radich J., Peña-Cerda M., Cortez G., Seguel I., Delporte C. 2015. Ethyl acetate extracts of different *Ugni molinae* Turcz. genotypes able to inhibit α -glucosidase. En: Congreso en conjunto entre las sociedades chilenas de farmacología, Ciencias Fisiológicas y Neurociencia: 2-25 de Septiembre, Coquimbo, IV Región, Chile.

Wang M., Carver J., Phelan V. *et al.* 2016. Sharing and community curation of mass spectrometry data with Global Natural Products Social Molecular Networking. *Nature Biotechnology* 34, 828–837.

Webber J., Jenkins R. H., Meran S., Phillips A., Steadman, R. 2009. Modulation of TGF-beta1-dependent myofibroblast differentiation by hyaluronan. *The American journal of pathology* 175(1), 148–160.

Werner S., Antsiferova M., 2016. Wound Healing: An orchestrated process of cell cycle, adhesion and signaling. *Encyclopedia of Cell Biology*. Elsevier Ltd. 3:216-222.

Wolska K.I., Grudniak A.M., Fiecek B., Krackiewicz-Dowjat A. Kurek A. 2010. Antibacterial activity of oleanolic and ursolic acids and their derivatives. *Central European Journal of Biology* 5(5):543–553.

Wu T., He M., Zang X., Zhou Y., Qiu T., Pan S., Xu X. 2013. A structure–activity relationship study of flavonoids as inhibitors of *E. coli* by membrane interaction effect. *Biochimica et Biophysica Acta* 1828:2751–2756.

Yang DJ., Moh SH., Son DH., You S., Kinyua AW., Ko CM., Song M., Yeo J., Choi YH., Kim KW. 2016. Gallic Acid Promotes Wound Healing in Normal and Hyperglucidic Conditions. *Molecules* 8;21(7) pii: E899.

Yamada K., Hamashima T., Ishii Y., Yamamoto S., Okuno N., Yoshida N., Yamada M., Huang T., Shioda N., Tomihara K., Fujimori T., Mori H., Fukunaga K., Noguchi M., Sasahara M.: 2018. Different PDGF receptor dimers drive distinct migration modes of the mouse skin Fibroblast. *Cellular Physiology and Biochemistry* 51:1461-1479.

Yokozawa T., Chen CP., Dong E., Tanaka T., Nonaka G-I., Nishioka I. 1998. Study on the Inhibitory Effect of Tannins and Flavonoids against the 1,1-Diphenyl-2-picrylhydrazyl. Radical. *Biochemical Pharmacology* 56(2):213-222

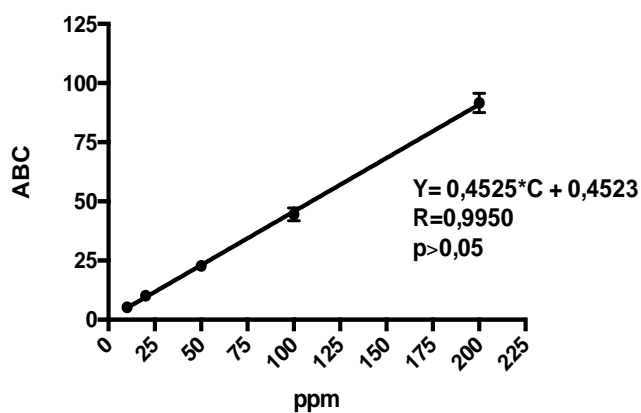
Yoshimura, M., Amakura, Y., Tokuhara, M. et al. 2008. Polyphenolic compounds isolated from the leaves of *Myrtus communis*. *Nature Medicine* 62: 366.

X. ANEXOS

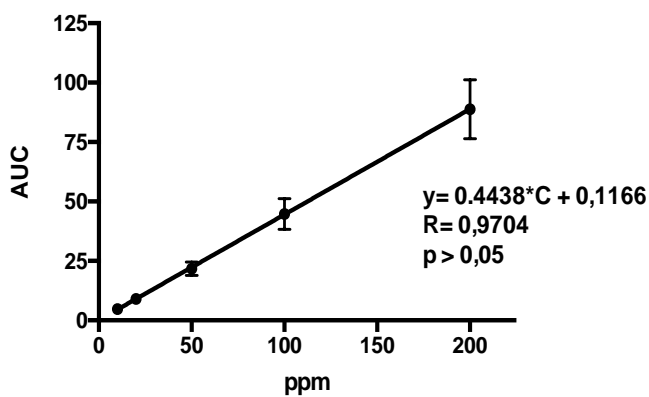
ANEXO 1

Curvas de calibración con los tripterpenos pentacíclicos utilizados como compuestos de referencia para la cuantificación por CLAE-DAD

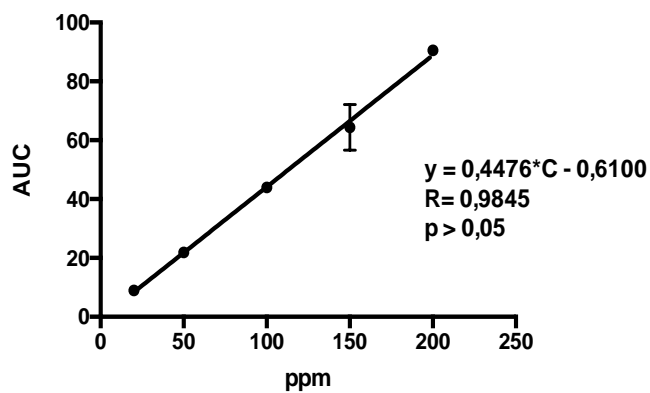
Ácido asiático



Ácido ursólico



Ácido oleanólico



ANEXO 2

Deficiones asociadas a derreplicación y creación de redes moleculares en la plataforma GNPS

Término	Definición
Derreplicación	Identificación rápida de moléculas previamente conocidas (conocidas)
Molecular networking	Un enfoque computacional que organiza los datos EM ² sobre la base de la similitud espectral, a partir de la cual podemos inferir relaciones en estructuras químicas
Molecular network	Un mapa de todos los nodos que ilustra la conectividad que representa el espacio químico detectado en el experimento.
Alineación de espectros	Un enfoque algorítmico que alinea los espectros relacionados. Esta es la base de la creación de redes moleculares, que se basa en el supuesto de que dos moléculas relacionadas estructuralmente comparten similitudes en sus espectros EM ² .
Edges (bordes)	Una línea que conecta nodos que representa espectros EM ² relacionados pero no idénticos sobre la base de una puntuación de similitud de coseno
Nodo	Un grupo de consenso de espectros EM ² idénticos, o un solo espectro EM ² si el tamaño del grupo es 1
Cosine score	Un valor que representa la similitud espectral EM ² entre dos nodos en una red molecular, donde una puntuación de coseno de 1 representa espectros idénticos y una puntuación de coseno de 0 no indica similitud alguna. La puntuación del coseno tiene en cuenta los iones precursores, los iones fragmentarios y las intensidades pico
MS-Cluster	Un algoritmo utilizado por GNPS para colapsar espectros EM ² casi idénticos con el mismo ion precursor m/z en un solo espectro de consenso

ANEXO 3

Acta de aprobación del proyecto para la utilización de fibroblastos dérmicos humanos por parte del Comité Ético Científico del Hospital Clínico de la Universidad de Chile

CA
HOSPITAL CLÍNICO
UNIVERSIDAD DE CHILE

ACTA DE APROBACION N° 047

Santiago, 31 julio de 2019.

El Comité Ético Científico de Investigación del Hospital Clínico de la Universidad de Chile, integrado por los siguientes miembros:

Dra. Ana María Madrid S. Médico Gastroenterólogo. Vicepresidente
Dr. Sergio Valenzuela P. Médico Gineco-Obstetra
Dr. Juan Carlos Prieto D. Médico Farmacología Clínica
Sra. Rina Sepúlveda A. Abogado.
Dra. Gloria López Stewart. Médico Endocrinóloga.
Dra. Teresa Massardo Vega. Médico Cirujano.
Dr. Juan Jorge Silva. Médico Cirujano.
Dra. Aida Verónica Araya. Médico Endocrinóloga.
Dr. Melchor Lemp Miranda. Médico Neurocirujano.
Sr. Mauricio Venegas Santos. Bioquímico.
Sra. Ginette Zúñiga Navarrete. Miembro de la comunidad

Ha analizado el proyecto "Evaluación comparativa de la actividad cicatrizante in vitro de extractos concentrados de fenoles y en triterpenoides obtenidos de hojas de distintos genotipos de *Ugnimolinæ Turcz*", cuya investigadora principal es la QF. Paula Valenzuela Bustamante, del Departamento de Ciencias Químicas y Farmacéuticas de la Universidad de Chile. Participa como investigador responsable de proyecto, el Dr. Carlos Sciaraffia Merino, de la Clínica Universidad de Chile Quilín. El proyecto será realizado en este mismo departamento del Hospital Clínico de la Universidad de Chile.

Para estos efectos se tuvo a la vista los siguientes documentos:

- Carta de presentación a Comité.
- Formulario de Solicitud de Evaluación de Proyecto de Investigación.
- Carta de Compromiso de la investigadora.
- Curriculum vitae de la investigadora.
- Presentación de Proyecto Versión 1, fechada mayo 2019.
- Consentimiento Informado Versión 2, fechado 22 julio de 2019.
- Revocación del Consentimiento Informado Versión 1, fechado 28 mayo de 2019.

El Proyecto y los documentos señalados en el párrafo precedente han sido analizados a la luz de los postulados de la Declaración de Helsinki, de las pautas Éticas Internacionales para la Investigación Biomédica en Seres humanos CIOMS 2002, de las Guías de Buenas Prácticas Clínicas de ICH y Normativa Nacional Vigente.

a) Carácter de la población estudiada
Terapéutica.

b) Utilidad del Proyecto

Adecuada.

c) Riesgos

Sin riesgos.

d) Beneficios

Adecuados.

e) Confidencialidad del Estudio

La investigadora principal asegura la confidencialidad de todos los datos.

Por lo tanto, el Comité estima que el Estudio propuesto estuvo bien justificado y que no significa para los sujetos involucrados riesgos físicos, psíquicos o sociales mayores. El consentimiento informado es adecuado en forma y fondo.

En virtud de las consideraciones anteriores, el Comité otorga la Aprobación Ética del estudio propuesto en sesión ordinaria del día 31 de julio de 2019, la que se extiende por un plazo de 12 meses a contar de esta fecha. Se adjunta nómina de los integrantes del Comité presentes en la sesión y Declaración de Cumplimiento de las Buenas Prácticas Clínicas.

Se debe tener presente que se debe realizar:

- Envío para aprobación o toma de conocimiento de nueva documentación relacionada al estudio.
- Cambio en los Delegados del Director de la Institución.
- Notificación de reacciones adversas serias o no serias, en que las serias deben ser notificadas en un plazo de 72 horas hábiles de ocurrido el evento.
- Enviar anualmente avances del Proyecto.
- Solicitud de Extensión de plazo de aprobación.
- Enviar Informe Final del Proyecto.

Los ítems mínimos que deben contener los informes semestrales y finales, son los siguientes:

- Cumplimiento de los objetivos
- Numero de Sujetos enrolados
- Número y motivo de los sujetos que abandonan o se retiran

Saluda atentamente a Ud.



Teresa Massardo Vega
 Presidenta del Comité Ético Científico
 Hospital Clínico de la Universidad de Chile

ANEXO 4

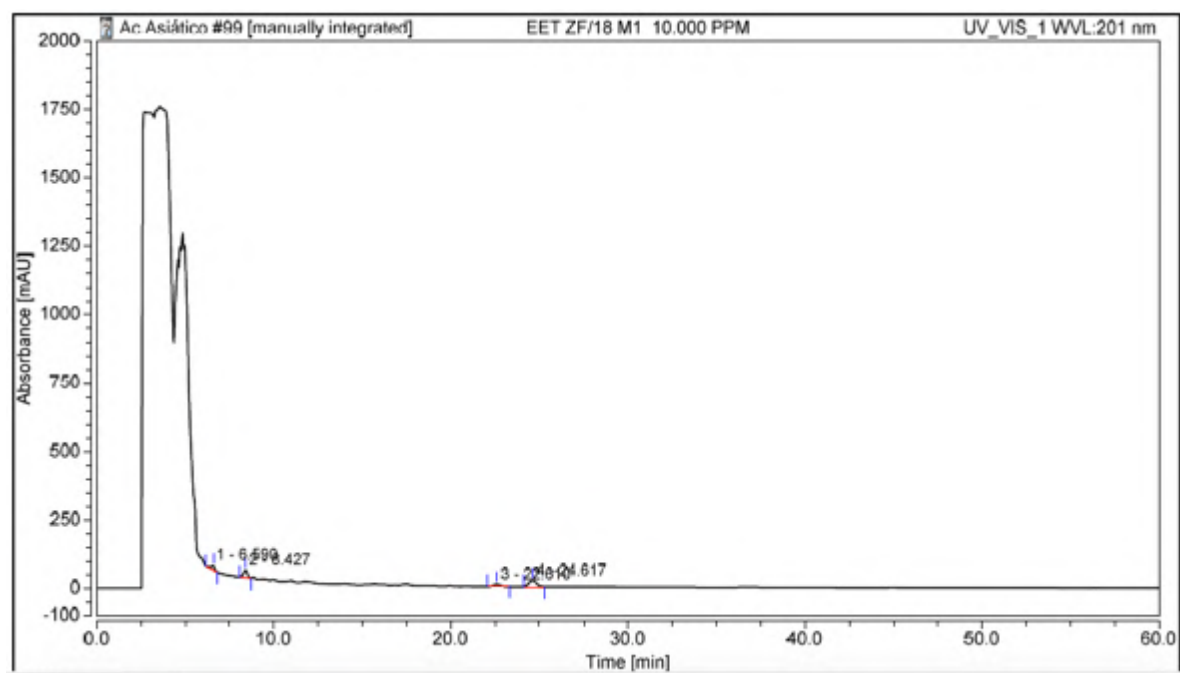
Contenido de triterpenos pentacíclicos de los EAEs obtenidos de las hojas de murtila de distintos genotipos mediante CLAE-DAD (Arancibia-Radich et al., 2016)

Genotipo	Ácido madecásico	Ácido asiático	Ácido alfitólico*	Ácido corosólico**	Ácido maslínico	Ácidos ursólico/oleanólico
8-2 ^L	0.5 ± 0.1 ^a	8.5 ± 0.1 ^{a,c}	5.4 ± 1.3 ^a	12.9 ± 2.6 ^a	13.3 ± 2.0 ^a	15.4 ± 0.8 ^a
14-4 ^L	0.5 ± 0.0 ^a	9.1 ± 0.3 ^a	ND	18.1 ± 0.4 ^b	10.2 ± 0.4 ^{b,c}	12.8 ± 0.7 ^b
19-1 ^L	0.5 ± 0.0 ^a	7.2 ± 0.2 ^{b,d,e}	1.7 ± 0.2 ^b	8.0 ± 0.3 ^c	10.5 ± 0.6 ^c	17.4 ± 0.2 ^{c,d,e}
19-1 ha ^L	0.3 ± 0.0 ^b	9.5 ± 0.1 ^a	2.9 ± 0.1 ^{c,d,e}	12.2 ± 0.1 ^{a,d,e}	16.0 ± 0.4 ^{d,f,g}	15.3 ± 0.4 ^a
ZF-18 ^L	0.4 ± 0.0 ^b	6.2 ± 0.3 ^e	4.0 ± 0.1 ^f	11.8 ± 0.6 ^{a,d}	11.6 ± 0.8 ^{a,b,c}	18.3 ± 1.0 ^{d,g}
22-1	0.4 ± 0.0 ^{a,b}	7.9 ± 0.1 ^{c,d}	2.8 ± 0.1 ^d	10.5 ± 0.7 ^{d,e,f}	18.8 ± 1.8 ^e	19.2 ± 3.2 ^{e,f,g}
23-2	0.5 ± 0.0 ^a	9.2 ± 0.8 ^a	3.7 ± 0.3 ^{e,f}	10.1 ± 0.7 ^{c,d,e}	16.7 ± 1.2 ^{e,f}	15.7 ± 0.6 ^{a,c}
27-1	0.4 ± 0.0 ^{a,b}	6.5 ± 0.6 ^{b,e}	ND	8.4 ± 0.3 ^{c,f}	17.1 ± 1.2 ^{e,f,g}	21.1 ± 1.0 ^f
31-1	0.3 ± 0.0 ^b	8.4 ± 0.6 ^{a,d,f}	ND	13.9 ± 2.2 ^a	13.7 ± 2.1 ^{a,d}	17.1 ± 1.4 ^{a,c,d}
19-2	0.9 ± 0.2 ^c	9.7 ± 2.0 ^a	ND	12.0 ± 3.0 ^{a,d}	14.6 ± 3.6 ^{a,d,f}	18.4 ± 0.7 ^{d,e}

Cada valor corresponde al promedio de la concentración obtenida de nueve determinaciones expresadas como g de triterpeno/g de extracto seco ± DE. * concentración expresada en ácido betulínico; ** concentración expresada en ácido ursólico; EAE: extracto acetato de etilo; ND: no detectable; misma letra (a, b, c, d, e, f and g) en cada columna representa valores que no son estadísticamente diferentes ($p > 0,05$); el análisis estadístico se realizó utilizando: test de carencia de ajuste (F), ANOVA de una vía y test de comparaciones múltiples de Tukey; los códigos de los genotipos con la letra L corresponden a los genotipos seleccionados debido a su alta producción de hojas.

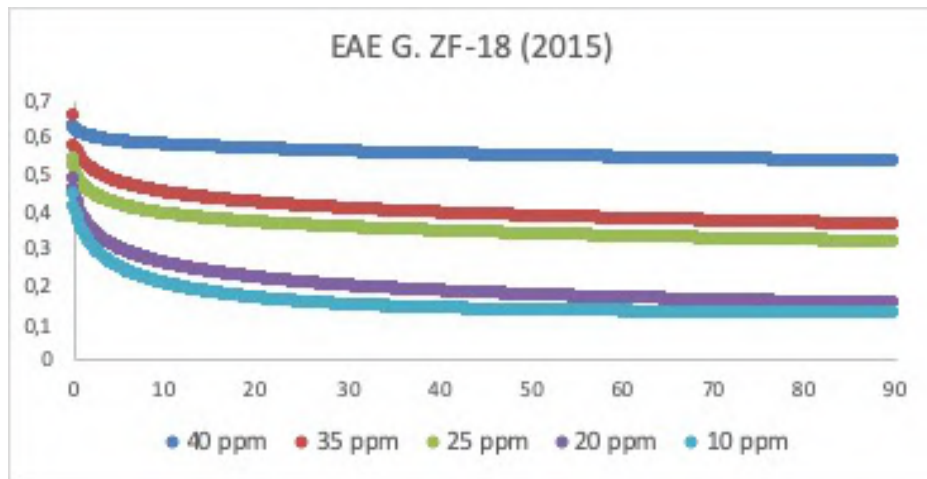
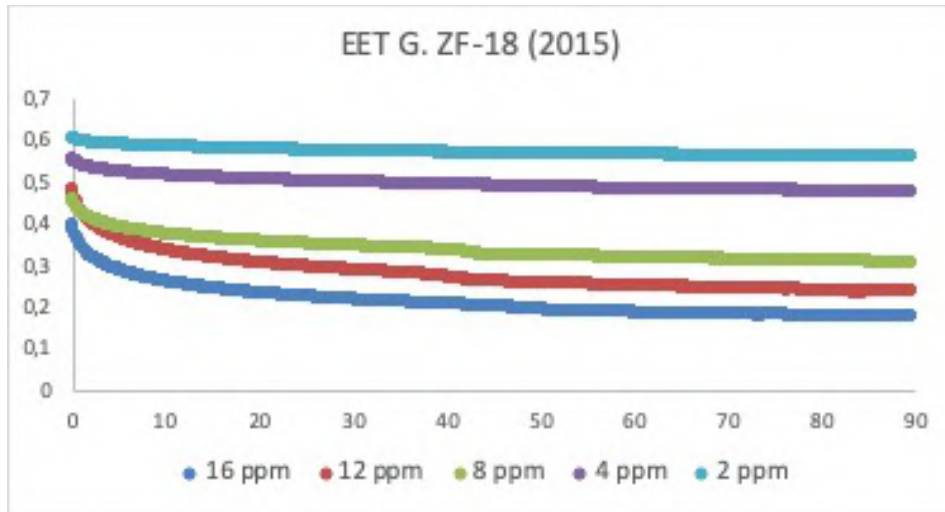
ANEXO 5

Cromatograma CLAE-DAD de los triterpenos pentacíclicos del EET G. ZF-18₂₀₁₅ a una concentración de 10.000 ppm y longitud de detección de 201 nm



ANEXO 6

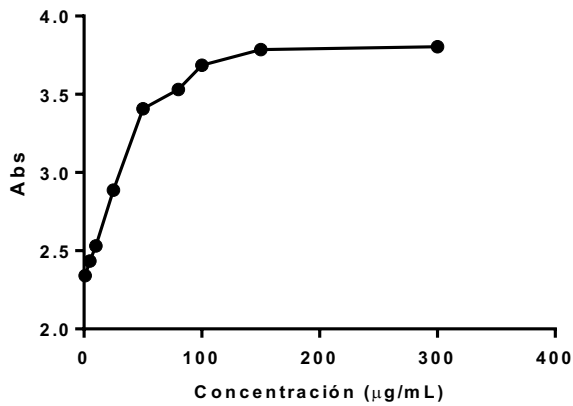
Curvas de decaimiento (90 min) del radical DPPH a distintas concentraciones del EET y EAE de las hojas de murtila del G. ZF-18₂₀₁₅



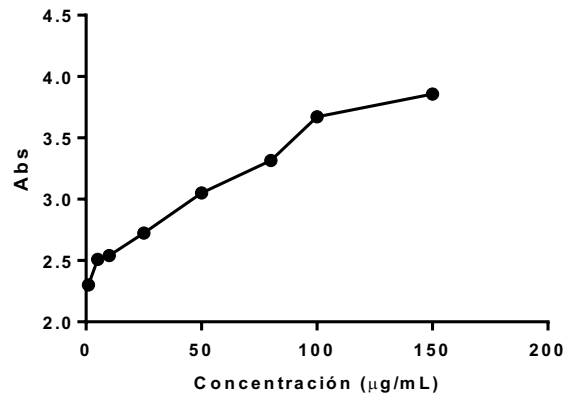
ANEXO 7

Prueba de solubilidad de los EETs y EAAs de los genotipos ZF-18₂₀₁₅ y 19-2 en medio acuoso (DMSO 1%)

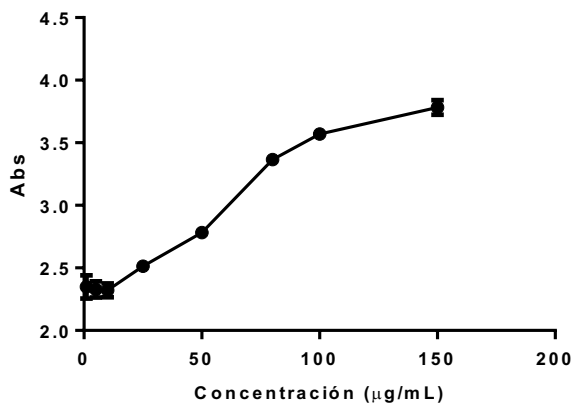
EET ZF-18₂₀₁₅



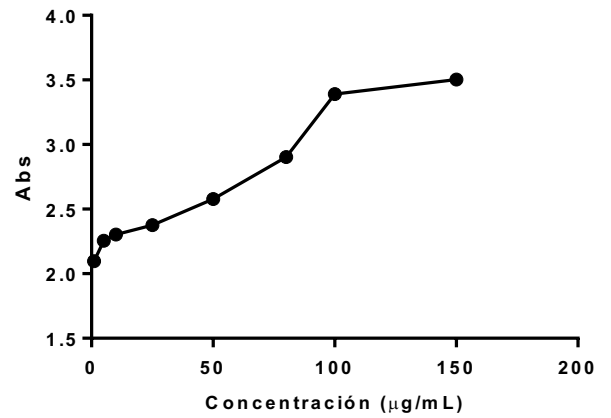
EAE ZF-18₂₀₁₅



EET 19-2

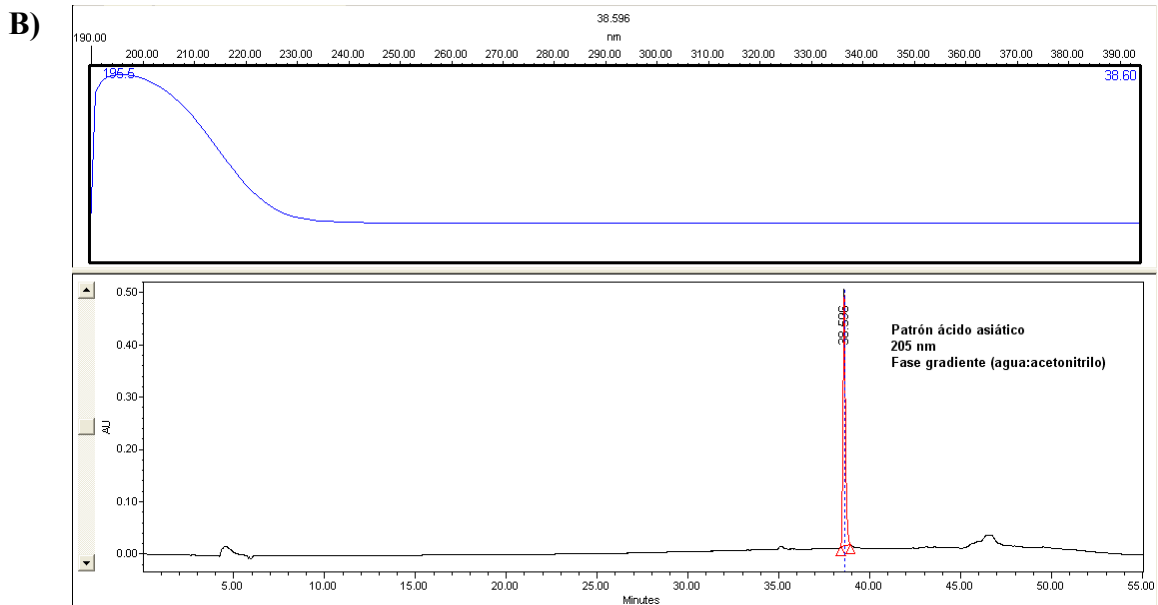
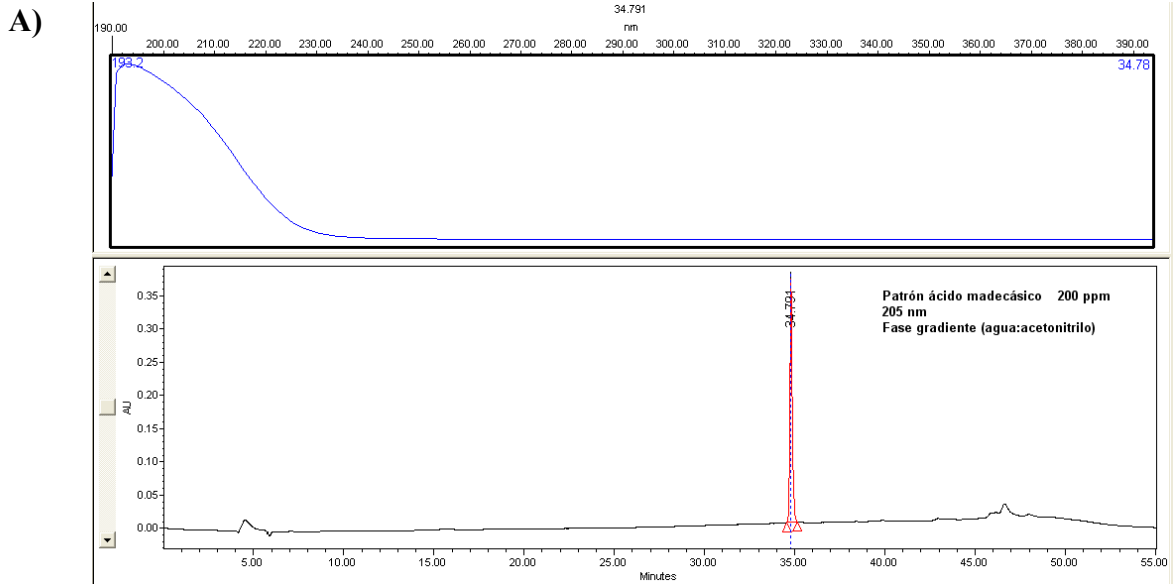


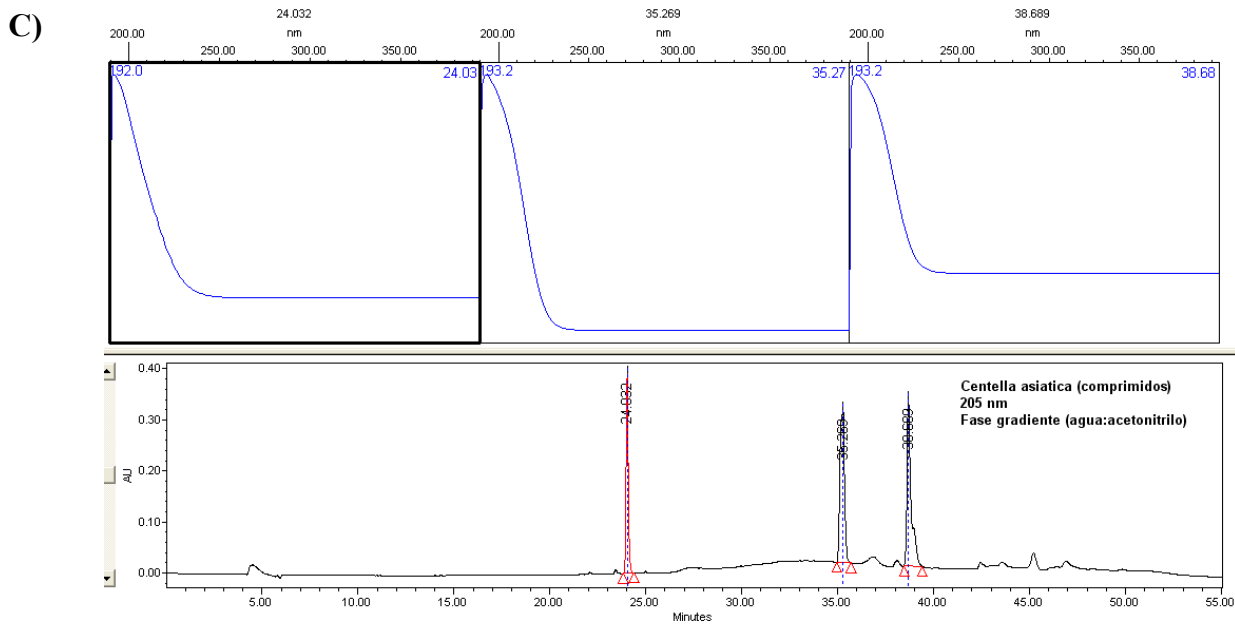
EAE 19-2



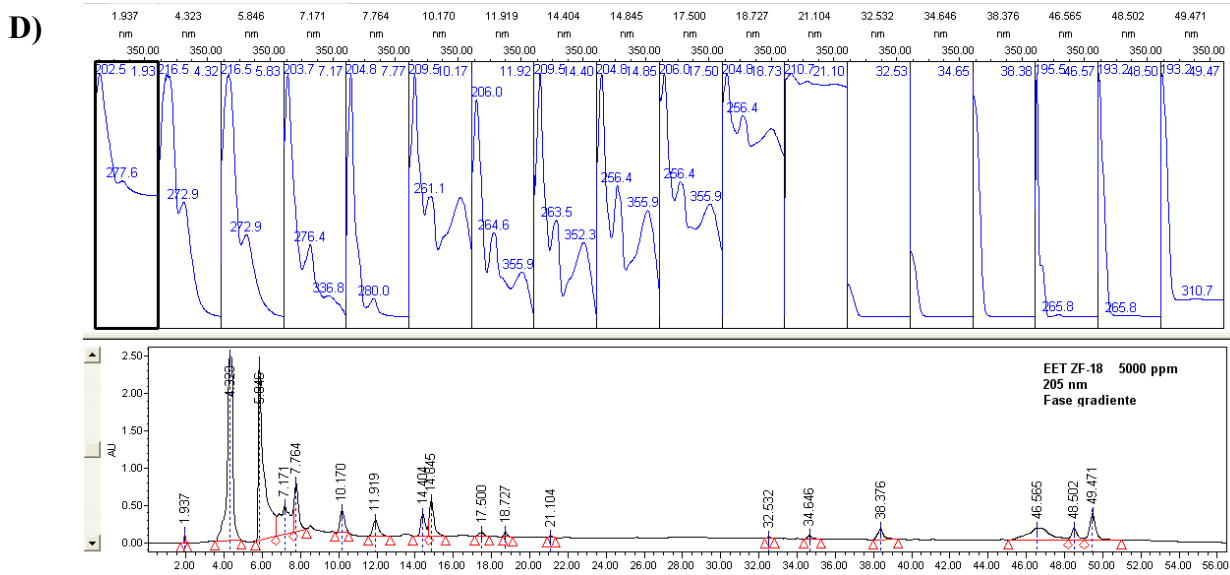
ANEXO 8

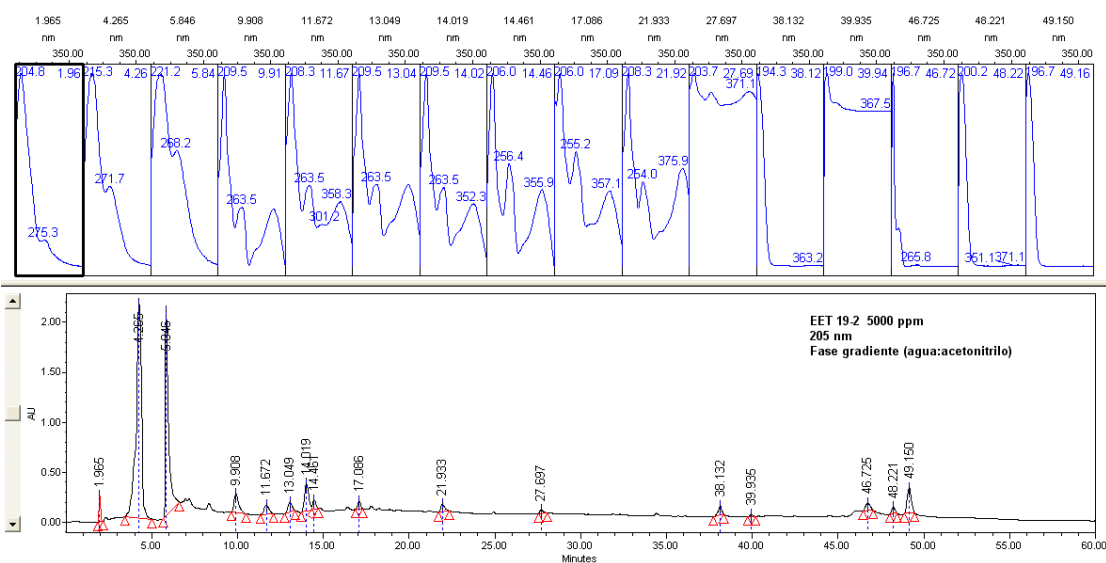
Comparación de triterpenos pentacíclicos de la *Centella asiatica* (extracto metanólico de comprimidos estandarizados) con triterpenoides de extractos de hojas murtila, mediante CLAE-DAD ($\lambda = 205$ nm)





Cromatograma CLAE-DAD a 205 nm del perfil de triterpenos pentacíclicos de un extracto metanólico de comprimidos de *Centella asiatica*. Los compuestos corresponden a asiaticósido ($t_r = 24,03$ min), ácido madecásico ($t_r = 35,27$ min) y ácido asiático ($t_r = 38,68$ min).

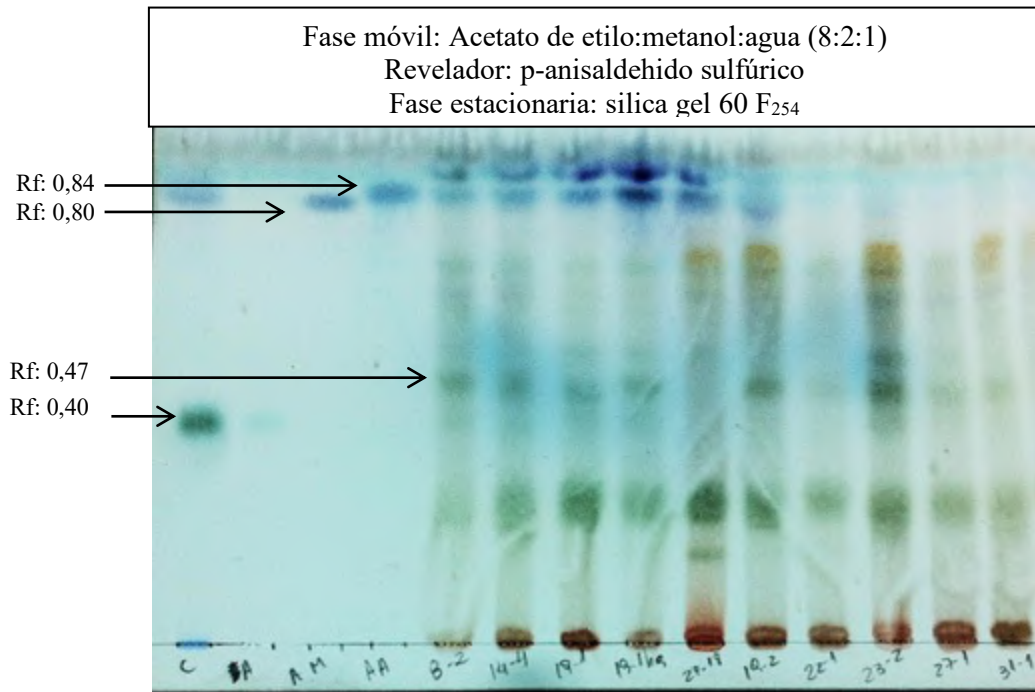


E)

Cromatogramas CLAE-DAD a 205 nm de extractos de *U. molinae*. D) EET G. ZF-18 y E) EET G.19-2 . Se compararon los tiempos de retención de los picos obtenidos por los EETs con los picos del cromatograma obtenido por un extracto metanólico de comprimidos de *C. asiatica*. De acuerdo al resultado, no fue posible identificar asiaticósido ($t_r = 24,03$ min) en ninguna de las muestras analizadas.

ANEXO 9

Comparación de triterpenos pentacíclicos de la *Centella asiatica* (extracto metanólico de comprimidos estandarizados) con triterpenoides de extractos de hojas murtilla, mediante cromatografía en capa fina (CCF)



Cromatografía en capa fina (CCF) de EETs obtenidos de las hojas de *U. molinae* de distintos genotipos (fase móvil para saponinas). C: *Centella asiatica*; A: Patrón de asiaticósido (Rf: 0,40); AM: Patrón de ácido madecásico (Rf: 0,80); AA: Patrón de ácido asiático (Rf: 0,84); M: extracto etanólico de hojas de murtilla de Cauquenes.

ANEXO 10

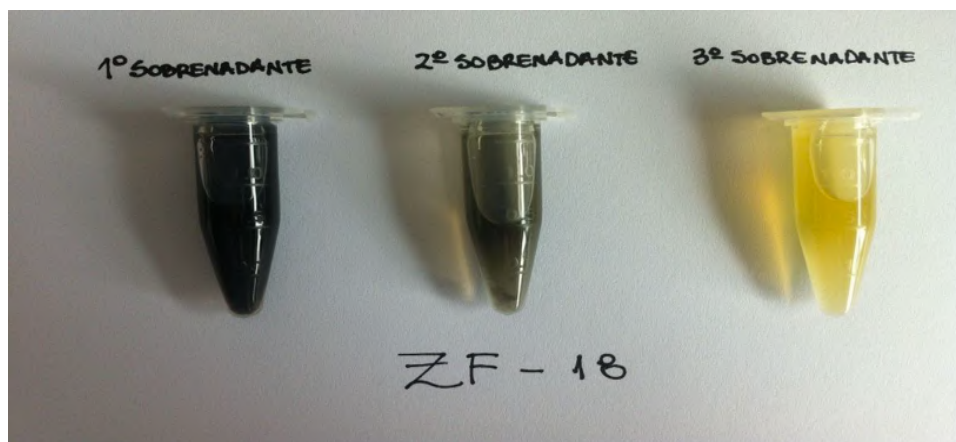
Proceso de separación de taninos mediante precipitación con gelatina

(A)



Precipitado de taninos con gelatina. El color azul se debe a la reacción colorimétrica con FeCl_3 1 % p/v para confirmar la presencia de taninos en el precipitado, luego de separarlos de los otros compuestos fenólicos de los extractos

(B)



Reacción con FeCl_3 1% (p/v) en los sobrenadantes del EET G. ZF-18 para cada etapa de la separación de taninos. En el tercer sobrenadante se observa una completa extracción de los taninos debido a la ausencia de color azul oscuro luego de agregar FeCl_3 1% (p/v). Las imágenes fueron obtenidas de la memoria de Avello (2016), “Determinación del contenido de taninos y evaluación de la disminución del infiltrado celular de distintos genotipos de *Ugni molinae* Turcz”.

ANEXO 11

Fotografías de los testigos herbarios de los genotipos ZF-18 y 19-2 de *U. molinae* Turcz.



Genotipo ZF-18
Selección por cantidad de hojas
SQF 22550



Genotipo 19-2
Selección por calidad del fruto
SQF 22557

ANEXO 12

PUBLICACIONES

Parra-Flores P., Riquelme J., **Valenzuela-Bustamante P.**, Leiva-Navarrete S., Vivar R., Cayupi-Vivanco J., Castro E., Espinoza-Pérez C., Ruz-Cortés F., Pedrozo Z., Lavandero S., Rodrigo R., Diaz-Araya G. 2019. The Association of Ascorbic Acid, Deferoxamine and N-Acetylcysteine Improves Cardiac Fibroblast Viability and Cellular Function Associated with Tissue Repair Damaged by Simulated Ischemia/Reperfusion. *Antioxidants* 3;8(12). SCOPUS

Peña-Cerda M., Arancibia-Radich J., **Valenzuela-Bustamante P.**, Pérez-Arancibia R., Barriga A., Seguel I., García L., Delporte C. 2017. Phenolic composition and antioxidant capacity of *Ugni molinae* Turcz. leaves of different genotypes. *Food Chemistry* 215:219–227. SCOPUS, WOS.

Arancibia-Radich J., Peña-Cerda M., Jara D., **Valenzuela-Bustamante P.**, Goity L., Valenzuela-Barra G., Silva X., Garrido G., Delporte C., Seguel I. 2016. Comparative study of anti-inflammatory activity and qualitative-quantitative composition of triterpenoids from ten genotypes of *Ugni molinae*. *Boletín Latinoamericano y del Caribe de Plantas Medicinales y Aromáticas* 15 (5): 274 – 287. SCOPUS

ANEXO 13

PRESENTACIONES A CONGRESOS

Valenzuela-Bustamante P., Seguel., Díaz-Araya G., Delporte C. *Ugni molinae* leaf extracts of ZF-18 genotype enhances attachment and cell migration of human skin fibroblasts. 2019. II Simposio Internacional sobre Química, Biología y Propiedades Farmacológicas de Productos Naturales, el IX Simposio Iberoamericano de Plantas Medicinales y el IV Simposio Iberoamericano de Investigación en Cáncer. Ciudad de Panamá, Panamá 5-8/02. Modalidad: Panel

Parra-Flores, P.I., **Valenzuela-Bustamante, P.**, Brüggendieck F.A., Vivar R., Díaz-Araya, G. Mecanismos moleculares implicados en la sobrevivencia, apoptosis y estrés oxidativo en fibroblastos cardiacos bajo isquemia/reperfusión activados por la asociación ascorbato/deferroxamina/N-acetilcisteína. 2018. XL Congreso anual de la sociedad de farmacología (SOFARCHI). 13-16/11. Hotel Santa Cruz, Santa Cruz, Provincia de Colchagua, Región de O'Higgins, Chile.

Valenzuela-Bustamante P., Parra P, Veas R, Seguel I, Díaz-Araya G, Delporte C. "Enhanced cell adhesion and proliferation of skin fibroblasts by ethanolic extracts of two genotypes of *Ugni molinae* Turcz. leaves". 2018. 30th International Symposium on the Chemistry of Natural Products and the 10th International Congress on Biodiversity (ISCNP30 & ICOB10). Atenas, Grecia 25-29/11. Modalidad: Panel

Valenzuela-Bustamante P., Campanini-Salinas J., Toro F., Peña-Cerda M., Seguel I., Vásquez D., Delporte C. 2017. Efecto del año de recolección sobre la composición fenólica, actividad antimicrobiana y antioxidante de hojas del genotipo ZF-18 de *Ugni molinae* Turcz, XXXIX Congreso Anual de la Sociedad de Farmacología de Chile, Puerto Varas, Chile, 22-25/11.

Valenzuela-Bustamante P., Campanini-Salinas J., Avello Z., Salas-Duguet V., Seguel I., Vásquez D., Delporte C. 2016. Antimicrobial activity of tannin-rich extracts from leaves of four *Ugni molinae* genotypes. XXXVIII Congreso Anual de la Sociedad de Farmacología de Chile, Castro, Chile, 26-29/09.

Lobos A., Correa A., García L., **Valenzuela-Bustamante P.**, Peña-Cerda M., Fernández M., Delporte C. 2016. Capacidad cicatrizante en fibroblastos y depósito de matriz extracelular de hojas de *Ugni molinae*. IV Congreso Latinoamericano de Plantas Medicinales. Universidad del Norte, Barranquilla, Colombia, 17-19/08.

Pérez-Arancibia R., **Valenzuela-Bustamante P.**, Peña-Cerda M., Seguel I., Delporte C. 2015. A comparative study of the in vitro antioxidant capacity of ethanolic extracts from leaves of different *Ugni molinae* genotypes. XXXVII Congreso Anual de la Sociedad De Farmacología de Chile, Coquimbo, Chile, 22-25/09.

Pérez-Arancibia R. Peña-Cerda M. Rivera-Gonzalez, D., **Valenzuela-Bustamante P.**, Seguel I., Delporte C. 2014. Capacidad para neutralizar el radical DPPH de cinco extractos de genotipos de murtila. 2° Congreso Latinoamericano de plantas medicinales, Universidad de Santiago de Chile, Santiago, Chile, 12- 14/08.

Peña-Cerda M., Arancibia J., Guzmán P., Pérez-Arancibia R., **Valenzuela-Bustamante P.**, Seguel I., García L., Delporte C. 2014. Diferencias en el contenido de triterpenos pentacíclicos presentes en los genotipos de hojas de *Ugni molinae*, 2° Congreso Latinoamericano de plantas medicinales, Universidad de Santiago de Chile, Santiago, Chile, 12-14/08.

Valenzuela-Bustamante P., Peña-Cerda M., Pérez-Arancibia R., Seguel I., García L., Delporte C. 2014. Diferencias en el valor FRAP y contenido fenólico entre diferentes genotipos de *Ugni molinae*. 2° Congreso Latinoamericano de plantas medicinales, Universidad de Santiago de Chile, Santiago, Chile, 12-14/08.

Valenzuela-Bustamante P., Peña-Cerda M., Pérez-Arancibia R., García L., Seguel I., Delporte C. 2014. “Determination of phenolic and flavonoid content, and evaluation of the reductive capacity over Fe^{+3} of different *Ugni molinae* genotypes, 14th International Congress of Ethnopharmacology ISE, Universidad de Talca, Puerto Varas, Chile, 23-26/09.

Pérez-Arancibia R., Peña-Cerda M. Rivera-González, D., **Valenzuela-Bustamante P.**, Seguel I., Delporte C. 2014. A comparative study of the DPPH radical scavenging kinetics of different *Ugni molinae* genotyp, 14th International Congress of Ethnopharmacology ISE 2014, Universidad de Talca, Puerto Varas, Chile, 23-26/09.

Peña-Cerda M., Arancibia J., **Valenzuela-Bustamante P.**, Pérez-Arancibia R., Bugueño I., Guzmán P., Seguel I., García L., Delporte C. 2014. Influencia del genotipo sobre la composición química y actividad farmacológica de las hojas de murtila, V Feria de Posgrado, Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas, Universidad de Chile, 20/08.