



Universidad de Chile

Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas

Departamento de Química Farmacológica y Toxicológica

CUANTIFICACIÓN DE FLAVONOIDES Y ÁCIDO GÁLICO EN HOJAS DE DISTINTOS GENOTIPOS DE *UGNI MOLINAE* TURCZ. Y EVALUACIÓN DE SU ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE.

Memoria para optar al título de Químico Farmacéutico

Rodrigo Nicolás Pérez Arancibia

Profesora Patrocinante

DRA. CARLA DELPORTE VERGARA

Depto. de Química Farmacológica y
Toxicológica

Directoras de memoria

DRA. CARLA DELPORTE VERGARA

Depto. de Química Farmacológica y
Toxicológica

DRA. LORENA GARCIA NANNIG

Departamento de Bioquímica y Biología
Molecular

Santiago, Chile 2015

A mis padres

Agradecimientos

Primero, deseo agradecer a mi familia. Agradezco infinitamente a mis padres, Marcelo Pérez y Claudia Arancibia, por todo lo que me han entregado, por todo lo que me han enseñado y por todas las oportunidades que me han dado. Su amor incondicional ha hecho que hoy sea lo que soy. Agradezco a mis abuelos, por estar siempre presentes y constantemente preocupados por mí, su cariño me hace feliz cada día. También agradezco a mis hermanos, Claudia y Daniel, por todo lo que hemos compartido a lo largo de tantos años, por todas las veces que han estado ahí cuando los he necesitado y por todo el cariño que siento de su parte.

También agradezco a Paula. Sin duda tu presencia hizo que mis días fueran más felices. Durante todos estos años, no solo fuiste mi pareja, sino que también fuiste mi compañera y mi mejor amiga. Sin ti a mi lado, todo esto hubiese sido más difícil de llevar a cabo.

Deseo agradecer a toda la familia del Laboratorio de Productos Naturales, en especial, a la profesora Carla Delporte, porque su guía fue fundamental en la realización de esta memoria, por siempre estar dispuesta a ayudar y por todo apoyo entregado. A Marcelo Peña y Gabriela Valenzuela, por la preocupación, por el apoyo y por la buena onda. A Paola, David, Catalina, Jorge, Daniela, Pamela, Consuelo, Diana e Ítalo, por haber sido parte de todo este proceso.

Agradezco, finalmente, a mis amigos, Diego Rivera, Renato Anfossi, Javier Tapia, Nicolás Arcos, Sofía Espinoza, Andy Woods y a todos aquellos que se preocuparon y me apoyaron durante el desarrollo de este trabajo.

Financiamiento

Esta tesis fue financiada por el proyecto FONDECYT N°1130155 dirigido por la Dra. Carla Delporte Vergara.

Índice General

	Página
ÍNDICE DE FIGURAS.....	IV
ÍNDICE DE TABLAS.....	VII
ÍNDICE DE ANEXOS.....	IX
ABREVIATURAS.....	X
RESUMEN.....	XII
ABSTRACT.....	XIII
INTRODUCCIÓN.....	1
1. HIPÓTESIS.....	6
2. OBJETIVOS.....	7
2.1. Objetivos generales.....	7
2.2. Objetivos específicos.....	7
3. MATERIALES Y MÉTODOS.....	8
3.1. Reactivos.....	8
3.2. Material vegetal.....	9
3.2.1. Recolección del material vegetal.....	9

3.2.2. Proceso de extracción del material vegetal.....	10
3.3. Análisis químico.....	11
3.3.1. Análisis químico-cualitativo para determinar la presencia de fenoles en los EETs de las hojas de los genotipos de Murtilla.....	11
3.3.2. Cuantificación de flavanonas totales mediante el ensayo colorimétrico con 2,4 DNP en los EETs de los genotipos de murtilla.....	11
3.3.2.1. Protocolo del ensayo.....	12
3.3.3. Ensayo de la cinética del apagamiento del DPPH● y determinación de la capacidad y eficiencia antioxidante de los EETs de los genotipos de murtilla.....	13
3.3.3.1. Reactivos.....	13
3.3.3.2. Protocolo del ensayo.....	14
3.3.3.3. Determinación de la EC ₅₀	15
3.3.3.4. Determinación del Tiempo Efectivo a la CE ₅₀ (TE ₅₀).....	16
3.3.3.5. Cálculo de la Eficiencia Antioxidante (AE).....	16
3.3.4. Identificación y contenido de quercetina, rutina ácido gálico y miricitrina de los EETs por CLAE-DAD.....	17
3.4. Análisis Estadístico.....	19
4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	20
4.1. Extracción del material vegetal.....	20
4.2. Análisis químico.....	21
4.2.1. Análisis químico-cualitativo de los extractos de murtilla por CCF.....	21

4.2.2. Cuantificación de flavanonas totales mediante el ensayo colorimétrico con 2,4 DNP de los EETs de los genotipos de murtila.....	23
4.2.3. Determinación de la capacidad y eficiencia antioxidante mediante el ensayo de cinética del radical DPPH.....	25
4.2.3.1. Determinación de las CE ₅₀ , TEC ₅₀ y AE.....	25
4.2.3.2. Comparación entre EA, CE ₅₀ y % de Flavanonas.....	30
4.2.3.3. Comparación entre el contenido fenólico, la AE y la CE ₅₀	33
4.2.4. Análisis de los EET de los genotipos de murtila mediante CLAE-DAD.....	36
4.2.4.1. Identificación y cuantificación de quercetina.....	36
4.2.4.2. Identificación y cuantificación de rutina.....	39
4.2.4.3. Identificación y cuantificación de ácido gálico.....	43
4.2.4.4. Correlación entre CE ₅₀ , AE y quercetina, rutina y ácido gálico.....	47
5. CONCLUSIONES.....	49
6. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	51

ÍNDICE DE FIGURAS

	Página
Figura 1: Rama con frutos de <i>Ugni molinae</i> , Parque Nacional Vicente Pérez Rosales, Región de Los Lagos, Chile.....	1
Figura 2: Estructura de distintos compuestos fenólicos.....	2
Figura 3: Núcleo estructural de los flavonoides.....	3
Figura 4: Reducción del radical DPPH (Z•) por una molécula antioxidante (AH).....	4
Figura 5: Preparación de los extractos seriados de hexano, diclorometano, acetato de etilo y etanólico.....	10
Figura 6: Cromatografías en capa fina de los extractos de murtila....	22
Figura 7: Curva de calibración de naringenina para la cuantificación de flavanonas.....	23
Figura 8: Cinética de neutralización del DPPH• por el EET 8-2.....	25
Figura 9: Gráfico de %DPPHrem vs concentración para el EET 8-2...	26
Figura 10: Gráfico de la cinética de neutralización del radical DPPH por el EET 8-2 a la CE ₅₀	27
Figura 11: Correlación entre la EA y el % de flavanonas presentes en los EETs de murtila.....	30

Figura 12: Gráfico comparativo de % de flavanonas vs EA.....	31
Figura 13: Correlación entre la CE ₅₀ y el % de flavanonas.....	31
Figura 14: Gráfico comparativo de %flavanonas vs CE ₅₀	32
Figura 15: Correlación entre la eficiencia antioxidante y los fenoles totales de los extractos de murtila.....	33
Figura 16: Gráfico comparativo de contenido fenólico vs EA.....	34
Figura 17: Correlación entre la CE ₅₀ y el contenido fenólico de los extractos de murtila.....	34
Figura 18: Gráfico comparativo de contenido fenólico vs la CE ₅₀	35
Figura 19: Estructuras de la quercetina y su 3-O-rutinosido (rutina).....	36
Figura 20: Cromatograma CLAE-DAD a 360 nm de quercetina.....	37
Figura 21: Cromatograma CLAE-DAD a 360nm del EET del genotipo 14-4.....	37
Figura 22: Curva de calibración de quercetina.....	38
Figura 23: Contenido de quercetina en los 10 EETs de murtila.....	39

Figura 24: Cromatograma CLAE-DAD a 360 nm de rutina.....	40
Figura 25: Cromatograma CLAE-DAD a 360 nm del EET del genotipo 23-2.....	40
Figura 26: Curva de calibración de rutina.....	41
Figura 27: Contenido de rutina en los EETs de murtila.....	43
Figura 28: Cromatograma CLAE-DAD a 270nm de ácido gálico.....	43
Figura 29: Curva de calibración de ácido gálico.....	44
Figura 30. Contenido de ácido gálico en los EET de murtila.....	45

ÍNDICE DE TABLAS

	Página
Tabla 1: Acciones de los genotipos recolectados, procedencia, criterio de selección y número del testigo herbario.....	9
Tabla 2: Condiciones cromatográficas para el análisis de las CCF para determinar la presencia de fenoles en los EETs de hojas de murtila.....	11
Tabla 3: Condiciones cromatográficas para el análisis por CLAE-DAD.....	18
Tabla 4: Programa de elución de las fases móviles.....	18
Tabla 5: Rendimientos de los extractos seriados.....	20
Tabla 6: Contenido y porcentaje p/p de flavanonas en los EETs de murtila.....	24
Tabla 7: Ecuaciones de la recta con su coeficiente de determinación, F calculado y F de tabla obtenidas desde los gráficos de %DPPHrem vs concentración de EET.....	26
Tabla 8: CE ₅₀ , TEC ₅₀ y AE de los EETs de los 10 genotipos de murtila y de quercetina.....	28
Tabla 9: Contenido de quercetina en los 10 genotipos de murtila analizados.....	38

Tabla 10: Contenido de rutina en los 10 genotipos de murtila analizados.....	41
Tabla 11: Contenido de ácido gálico en los EETs de murtila.....	44
Tabla 12: Resumen del contenido de compuestos fenólicos presentes en los EETs de murtila.....	46
Tabla 13: Coeficiente de Pearson obtenido para la correlación entre los compuestos fenólicos cuantificados en los EETs.....	47
Tabla 14: Correlación entre CE ₅₀ , EA y quercetina, rutina y ácido gálico.....	47

ÍNDICE DE ANEXOS

	Página
Anexo 1: Testigos herbarios de los 10 genotipos de murtilla.....	55
Anexo 2: Gráficos del ensayo del radical DPPH.....	60
Anexo 2.a: Gráficos de la cinética de atrapamiento del DPPH•...	60
Anexo 2.b: %DPPHrem vs Conc de los EETs y de quercetina...	66
Anexo 2.c: Gráficos de TEC ₅₀	68
Anexo 3: Cromatogramas obtenidos por CLAE-DAD.....	70
Anexo 3.a: Cromatogramas CLAE a 270 nm para la identificación y cuantificación de ácido gálico.....	70
Anexo 3.b: Cromatogramas CLAE a 360 nm para la identificación y cuantificación de quercetina, rutina y miricitrina.....	73
Anexo 4: Resúmenes de congresos asistidos.....	77
Anexo 4.a: “A comparative study of the DPPH• radical scavenging kinetics of different <i>Ugni molinae</i> genotypes.” 14th International Congress of Ethnopharmacology ISE 2014.....	77
Anexo 4.b: “Capacidad para neutralizar el radical DPPH de cinco extractos de genotipos de murtilla.” 2° Congreso Latinoamericano de plantas medicinales.....	78

ABREVIATURAS

%DPPHrem:	Porcentaje de DPPH● remanente
%p/p	Porcentaje peso/peso
2,4 DNP:	2,4 dinitrofenilhidrazina.
EA:	Eficiencia antioxidante
CCF:	Cromatografía en capa fina
CLAE:	Cromatografía líquida de alta eficiencia.
CLAE-DAD:	Cromatografía líquida de alta eficiencia acoplada a arreglo de diodos.
Conc	Concentración
DCM:	Diclorometano.
DPPH●:	Radical 2,2-difenil-1-picrilhidrazil
DS:	Desviación estándar
EAE:	Extracto acetato de etilo.
EAG:	Equivalentes de ácido gálico
CE ₅₀ :	Concentración efectiva 50
EDCM:	Extracto diclorometano.
EET:	Extracto etanólico.
EH:	Extracto hexánico.
ES:	Extracto seco
EtOAc:	Acetato de etilo.
H ₂ SO ₄ :	Ácido sulfúrico
HCOOH:	Ácido fórmico
MeOH:	Metanol.
mg:	Miligramos
nm:	Nanómetros
NP/PEG:	Reactivo revelador Natural Product/Polietilenglicol

ppm:	Partes por millón
r:	Coefficiente de correlación de Pearson
R _f :	Factor de retardo
ROS:	Especies reactivas del oxígeno
TEC ₅₀	Tiempo efectivo a la EC ₅₀
uA:	Unidades de absorbancia
UV:	Ultravioleta
µg:	Microgramos

RESUMEN

La murtila es un arbusto silvestre que crece en la zona centro-sur de Chile. Sus hojas han sido utilizadas en la medicina tradicional chilena debido a sus propiedades como antiinflamatoria, analgésica, antimicrobiana y antioxidante. Las propiedades benéficas de la murtila se deben, en parte, a la presencia de compuestos fenólicos en sus hojas, principalmente compuestos del tipo flavonoides. Diversos estudios previos han demostrado la presencia de quercetina, miricetina, epicatequina y algunos de sus derivados glicosilados en las hojas de murtila.

El objetivo de este estudio fue demostrar que la actividad antioxidante de los extractos etanólicos (EETs) obtenidos desde hojas de diferentes genotipos de murtila varía según la composición de compuestos fenólicos presentes en dichas hojas. Con este fin, se: a) determinó la capacidad y eficiencia antioxidante (CE_{50} y EA respectivamente) de los extractos a través del método del radical DPPH, b) cuantificó el porcentaje de flavanonas presentes en los EETs a través del ensayo colorimétrico con 2,4 dinitrofenilhidrazina (2,4 DNP), y c) determinó la presencia de quercetina, rutina, miricitrina y ácido gálico en los EETs a través de cromatografía líquida de alta eficiencia con arreglo de diodos (CLAE-DAD).

Los resultados indicaron que existen diferencias significativas ($p < 0,05$) en las CE_{50} y la EA de los EETs, siendo el de menos CE_{50} el EET del genotipo ZF-18 y el EET 14-4 el que obtuvo la mayor EA ($2,12 \pm 0,03 \times 10^{-3}$). Estas diferencias pueden deberse a las diferencias encontradas en la composición de los EETs, en los cuales se pudo identificar y cuantificar quercetina, rutina y ácido gálico. También existieron diferencias en el %flavanonas, siendo los genotipos 8-2 y 23-2 los que obtuvieron los mayores porcentajes ($7,79 \pm 0,14\%$ y $7,75 \pm 0,4\%$ respectivamente), aunque estas no influyeron en la actividad antioxidante de los EETs. Considerando que los 10 genotipos fueron cultivados en las mismas condiciones, las diferencias encontradas en los EETs se deben a las diferencias en sus genotipos.

SUMMARY

“QUANTIFICATION OF FLAVONOIDS AND GALLIC ACID IN LEAVES OF DIFFERENT GENOTYPES OF *Ugni molinae* TURCZ AND EVALUATION OF THEIR ANTIOXIDANT ACTIVITY.”

Murtilla is a wild shrub that grows in south-central Chile. Its leaves have been commonly used on Chilean folk medicine because of its anti-inflammatory, analgesic, antimicrobial and antioxidant properties. These properties are due, in part, to the presence of phenolic compounds in murta leaves, mostly flavonoid-type compounds. Previous studies have accomplished the identification of quercetin, myricetin, epicatechin and some of their glycosylated derivatives in murta leaves.

The aim of this study is to prove that the antioxidant activity of the ethanolic extracts (EET) obtained from leaves of different murta's genotypes varies due to the phenolic compounds composition of such leaves. For this purpose: a) the antioxidant capacity and the efficiency (CE_{50} and EA respectively) were calculated through the DPPH• method, b) the percentage of flavanones (%flavanones) was quantified through the 2,4 DNP colorimetric assay, and c) the presence of quercetin, rutin, myricitrin and gallic acid was determined using high-performance liquid chromatography with photodiode array detector (CLAE-DAD).

The results indicated that there were significant differences ($p < 0,05$) among the CE_{50} and EA of the EETs, being the EETs of the ZF-18 and 14-4 genotype the ones that got the lower CE_{50} ($9,3 \pm 0,6$ ppm) and greater EA ($2,12 \pm 0,03 \times 10^{-3}$) respectively. Such differences may be due to the differences found in the composition of the EETs, in which quercetin, rutin and gallic acid were identified. Also, there were differences among the %flavanones, being the EETs of the 8-2 and 23-2 genotypes the ones that obtained the greater percentages ($7,8 \pm 0,1\%$ y $7,8 \pm 0,4\%$ respectively), although the flavanones did not influence the antioxidant activity of the EETs. Since all of the murta's genotypes analyzed were cultivated under the same conditions, the differences found between the EETs are due to their genotype differences.

INTRODUCCIÓN

La murtila (*Ugni Molinae* Turcz), también conocida como “murta” o “mutilla” (Hauser *et al*, 2014), es una planta silvestre nativa del sur de Chile que crece arbustivamente en los bordes de bosques y en sotobosques (Pastenes *et al*, 2003) de los faldeos cordilleranos de la zona centro-sur del país. La murta, perteneciente a la familia Myrtaceae, fue identificada y clasificada por botánicos occidentales por primera vez en 1884 (Rubilar *et al*, 2006). Es una planta muy apreciada debido a que sus pequeños frutos globosos son comestibles y poseen un sabor agradable (Aguirre *et al*, 2006).

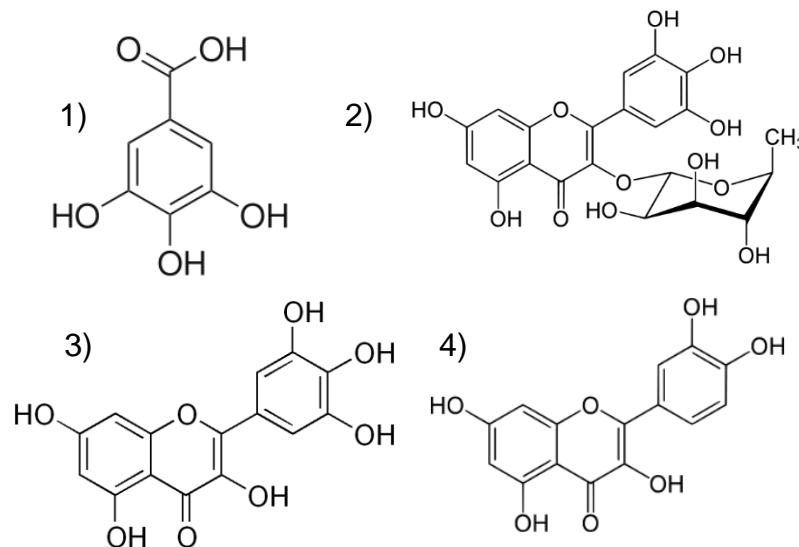


Figura 1. Rama con frutos de *Ugni molinae*, Parque Nacional Vicente Pérez Rosales, Región de los Lagos, Chile

Esta planta ha sido utilizada durante mucho tiempo por pueblos nativos chilenos, como los Mapuches, Puelches y Pehuenches debido a sus propiedades antiinflamatorias, analgésicas (Delporte *et al*, 2007), antimicrobianas, antioxidantes (Hauser *et al*, 2014) y para el tratamiento de diarreas y disentería.

Debido a estas propiedades y a su aplicación en la manufactura de diversos alimentos, la murtila ha ganado mucha atención por parte de los agricultores chilenos para la producción de mermeladas, jaleas, té y licores (Taobada *et al*, 2010). También ha ganado atención por parte de la industria cosmética, donde los extractos de la hoja de murta han sido utilizados para la producción de productos cosméticos que afirman ser descongestionantes, regeneradores de la piel y neutralizadores del estrés oxidativo (Aguirre *et al*, 2006).

Las propiedades benéficas de la murtila se deben, en parte, a la presencia de diversos compuestos fenólicos, principalmente flavonoides del tipo flavonoles y flavanoles, entre los cuales se han identificado quercetina, miricetina, epicatequina y algunos de sus derivados glicosilados a través de la técnica de cromatografía líquida de alta eficiencia (CLAE) acoplada a espectrometría de masa en extractos polares de la hoja de murta (Rubilar *et al*, 2006).



- 1) Ácido gálico
- 2) Miricitrina
- 3) Miricetina
- 4) Quercetina

Figura 2. Estructura de distintos compuestos fenólicos

Los flavonoides corresponden a un gran grupo de metabolitos secundarios ampliamente distribuidos en el reino vegetal, y que forman una parte importante de la dieta humana debido a su extensa presencia en frutas, verduras, vinos y té. Estos compuestos fenólicos se forman a partir de los aminoácidos fenilalanina y malonato, y poseen como estructura básica un esqueleto C6-C3-C6 que consiste en dos anillos C6 aromáticos y un anillo heterocíclico que contiene un átomo de oxígeno. Esta estructura básica de 15 átomos de carbono se conoce como núcleo flavano. Estos metabolitos secundarios gozan de una gran cantidad de roles funcionales en las plantas y en su interacción con el medio ambiente, dentro de los que podemos nombrar la protección contra la radiación ultravioleta, patógenos y herbívoros (Heim, 2002), lo que es consistente con su presencia en una amplia gama de compartimientos celulares y sub-celulares (Agati *et al*, 2012).

Los flavonoides se encuentran principalmente en las plantas en la forma de glicósidos, es decir, unidos a azúcares. Estos azúcares comúnmente se unen a los hidroxilos de los carbonos C3 y/o C7 formando así O-glicósidos, siendo la D-glucosa y la L-ramnosa los azúcares más comúnmente unidos a las agliconas (Verri Jr. *et al*, 2012)

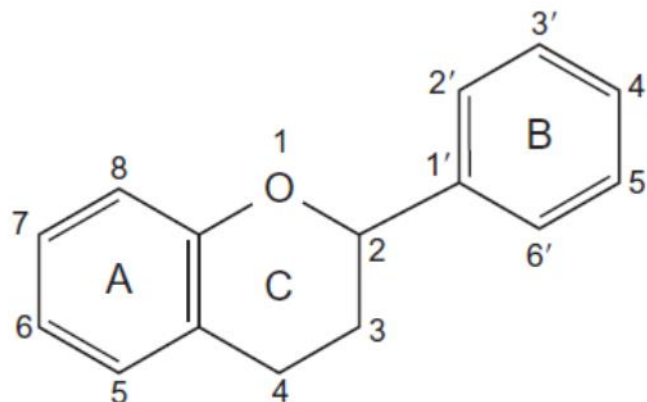


Figura 3. Núcleo estructural de los flavonoides

Los compuestos del tipo flavonoides, al igual que otros compuestos polifenólicos, son capaces de contrarrestar el estrés oxidativo. El estrés oxidativo se produce cuando existe un desbalance entre la formación de especies reactivas del oxígeno (ROS), las cuales poseen un electrón desapareado, y los sistemas antioxidantes del organismo (Avello & Suwalsky, 2006).

Cuando los antioxidantes presentes en el organismo se ven sobrepasados por los ROS, se puede generar un daño oxidativo en biomoléculas tales como lípidos de membrana, proteínas y ADN, como también la desregulación en el control del ciclo celular y una de las consecuencias es la aparición de enfermedades crónicas. Uno de los mecanismos de los polifenoles es inhibir la generación de ROS al donar un electrón para eliminar la condición desapareada de estas especies reactivas, previniendo así la progresión de numerosas enfermedades, tales como la aterosclerosis y el cáncer (Rubilar *et al*, 2006). Además, debido a la prevención de la oxidación de lípidos, los polifenoles pueden mejorar y extender la vida útil de aquellos alimentos que son sensibles a la oxidación (Hauser *et al*, 2014).

El potencial antioxidante de diferentes extractos obtenidos a partir de las hojas de murtila ha sido comprobado a través del ensayo con el radical 2,2-difenil-1-picrilhidrazil (DPPH●) (Rubilar *et al*, 2006; Rubilar *et al*, 2011; Hauser *et al*, 2014). Este ensayo determina la capacidad de los compuestos antioxidantes de reducir el nitrógeno con un electrón desapareado presente en el DPPH● al donar un átomo de hidrogeno o un electrón. El DPPH● posee un color violeta intenso con una absorción a los 517 nm en solución metanólica. Esta coloración va disminuyendo en forma proporcional a la aparición de la forma reducida en presencia de un antioxidante (Kedare, 2011).

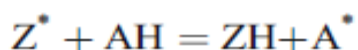


Figura 4. Reducción del radical DPPH (Z●) por una molécula antioxidante (AH)

También se ha descrito la presencia de compuestos triterpénicos en extractos de hojas de murtila obtenidos a partir de la extracción sucesiva del material vegetal a temperatura ambiente con hexano, diclorometano (DCM), acetato de etilo (EtOAc) y metanol (MeOH), como lo son el ácido betulínico, ácido corosólico, y una mezcla de los ácidos oleanólico y ursólico (Aguirre *et al*, 2006). Estos extractos demostraron poseer una actividad anti nociceptiva dosis dependiente al ser estudiados en modelos *in vivo* de dolor, lo que estaría relacionado con la presencia de flavonoides glicosilados y triterpenoides (Delporte *et al*, 2007).

En el año 2000, Seguel *et al.* demostraron que *Ugni molinae* presenta una alta variabilidad genética. Dicho estudio fue realizado a través de la genotipificación mediante microsatélites de 100 especies silvestres recolectadas en un área que se extiende entre las VII y X Región.

Por el antecedente mencionado anteriormente, en esta memoria se determinó en forma comparativa la capacidad y eficiencia antioxidante, y los contenidos de quercetina, rutina, miricitrina, ácido gálico y flavanonas totales de los EETs obtenidos desde las hojas de diez genotipos de murtila cultivados en las mismas condiciones edafoclimáticas con el fin de demostrar las diferencias debidas al genotipo.

1. HIPÓTESIS

Las hojas de los diferentes genotipos de *Ugni molinae* Turcz., cultivados bajo las mismas condiciones, presentan distinta capacidad y eficiencia antioxidante, debido a que contienen diferentes concentraciones de quercetina, ácido gálico, miricitrina y rutina, y contenido de flavanonas totales.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivos generales

- Demostrar la variación en la capacidad y eficiencia antioxidante de los extractos etanólicos obtenidos desde las hojas de distintos genotipos de *Ugni molinae* Turcz cultivado en las mismas condiciones, correlacionando dicha actividad con el contenido de compuestos fenólicos.

2.2 Objetivos específicos

- Demostrar en forma comparativa la presencia y el contenido de quercetina, rutina, miricitrina y ácido gálico de los EETs obtenidos a partir de las hojas de diez genotipos de murtila.
- Determinar en forma comparativa el contenido de flavanonas totales presentes en los EETs.
- Evaluar la capacidad y eficiencia antioxidante de los EETs.
- Determinar la influencia del genotipo de murtila sobre la composición fenólica y la capacidad y eficiencia antioxidante de los EETs.

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1 Reactivos

Para la realización de esta tesis se utilizaron reactivos para CLAE como: metanol (MeOH), acetonitrilo y ácido fórmico, adquiridos en Merck (Damstadt, Alemania), y agua milli-Q preparada por un sistema Milipore Mili-Q Plus (Milipore, Bedford, MA, USA).

Se utilizó hexano, diclorometano (DCM), acetato de etilo (AcOEt) y etanol de grado de laboratorio para las extracciones, y solventes p.a. como metanol y ácido sulfúrico (H₂SO₄) de Merck para la realización de los ensayos del radical DPPH y del 2,4 DNP

Compuestos de referencia como quercetina, rutina, miricitrina, ácido gálico, 2,4 dinitrofenilhidrazina, radical 2,2-difenil-1-picrilhidrazil, naringenina fueron adquiridas en Sigma-Aldrich (Oakville, ON, USA).

3.2 Material vegetal

3.2.1 Recolección del material vegetal

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

La selección de las hojas de 10 genotipos de murtila que fueron estudiados en esta memoria se realizó de acuerdo con el siguiente criterio: 5 genotipos fueron seleccionados por la calidad de sus frutos, siendo los 5 restantes seleccionados por la cantidad de hojas (Tabla 1). Se guardaron testigos herbarios de los 10 genotipos en el herbario de la Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas de la Universidad de Chile. Las fotos de cada uno los testigos se muestran en el Anexo 1.

Tabla 1. Accesiones de los genotipos recolectados, procedencia, criterio de selección y número del testigo de herbario

GENOTIPO	Región	Localidad	SELECCIÓN	Código Herbario
8-2	Del Maule	Cauquenes	Número de hojas	SQF 22571
14-4	La Araucanía	Puren	Número de hojas	SQF 22549
19-1	La Araucanía	Porma	Número de hojas	SQF 22554
19-1 _{ha}	La Araucanía	Porma	Número de hojas	SQF 22553
ZF-18	Los Lagos	Putique	Número de hojas	SQF 22550
22-1	Los Ríos	Mehuín	Calidad de frutos	SQF 22552
23-2	La Araucanía	Queule	Calidad de frutos	SQF 22556
27-1	Los Lagos	Aucar	Calidad de frutos	SQF 22555
31-1	Los Lagos	Lenca	Calidad de frutos	SQF 22551
19-2	La Araucanía	Porma	Calidad de frutos	SQF 22557

3.2.2 Proceso de extracción del material vegetal

El material vegetal seco fue sometido a extracciones sucesivas, a temperatura ambiente, con solventes de polaridad creciente:

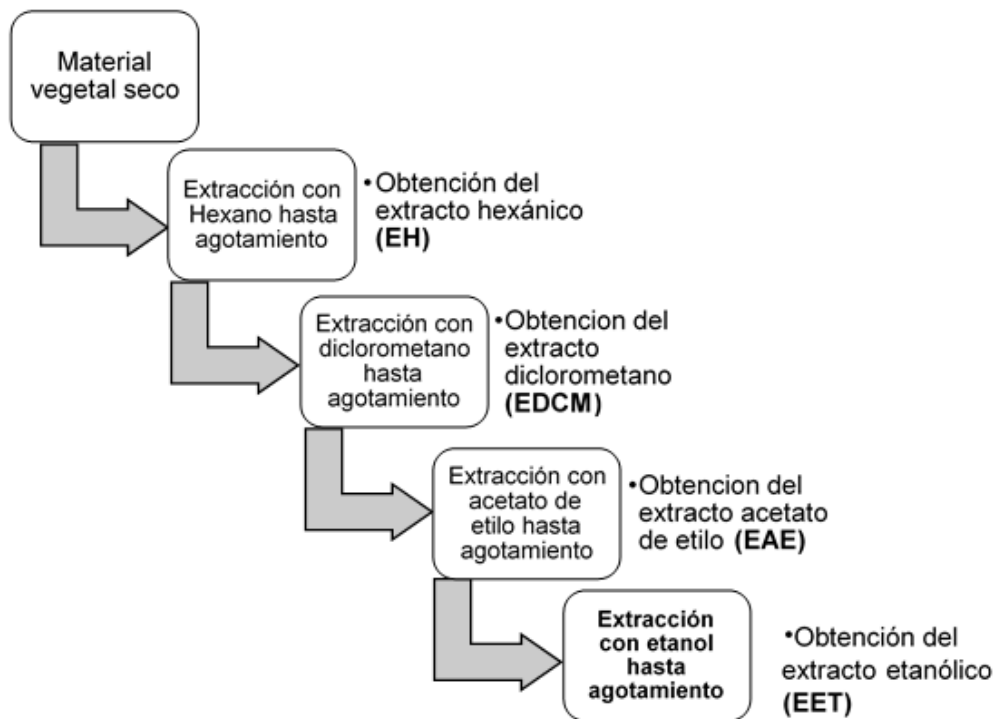


Figura 5. Preparación de los extractos seriados de hexano, diclorometano, acetato de etilo y etanólico

Cada extracción se llevó a cabo hasta el total agotamiento del material vegetal, el cual fue nuevamente llevado a sequedad previo a la adición del siguiente solvente.

Los extractos obtenidos fueron concentrados con la utilización de un evaporador rotatorio a presión reducida, siendo llevados a sequedad a través de una corriente de aire caliente (30°C). Una vez secos, se procedió a molerlos y luego a almacenarlos en envases de plástico adecuadamente etiquetados.

3.3 Análisis químico

3.3.1 Análisis químico-cualitativo para determinar la presencia de fenoles en los EETs de las hojas de los genotipos de murtila

El análisis químico-cualitativo de los EETs se realizó mediante la técnica de cromatografía en capa fina (CCF). Para esto se utilizaron cromatofolios de gel de sílice Merck F-254. Con el fin de determinar la presencia de compuestos polifenólicos, se utilizaron distintas fases móviles y como revelador el reactivo NP/PEG (Tabla 2).

Tabla 2. Condiciones cromatográficas de las CCF para determinar la presencia de fenoles en los EETs de hojas de murtila

Fase Móvil	Proporción	Revelador/ λ
AcOEt : HCOOH : CH ₃ COOH : H ₂ O	10 : 1,1 : 1,1 : 2,6	NP/PEG / UV 366 nm
AcOEt : DCM: CH ₃ COOH : H ₂ O	6 : 3 : 1 : 2	NP/PEG / UV 366 nm

3.3.2 Cuantificación de flavanonas totales mediante el ensayo colorimétrico con 2,4 DNP en los EETs de los genotipos de murtila

La cuantificación de flavanonas se llevó a cabo utilizando el método del 2,4 DNP descritos por Chang *et al* (2002) y Popova *et al* (2003), de los cuales se modificaron los volúmenes utilizados para poder realizar la medición en un lector de microplacas. El método de cuantificación se basa en la capacidad de las flavanonas de reaccionar con el 2,4 DNP para formar 2,4 dinitrofenilhidrazonas, compuestos que son coloreados y que poseen un máximo de absorbancia a 495 nm (Chang *et al*, 2002). Para llevar a cabo la cuantificación de flavanonas de los diferentes EETs, se construyó una curva de calibración con naringenina. Se utilizaron concentraciones de naringenina en un rango de concentración entre

0,42 y 8.64 $\mu\text{g/mL}$. El contenido de flavanonas se expresó como los mg de naringenina presentes en 1 g de extracto seco (ES) y a partir de este valor se calculó el porcentaje de flavanonas (% de naringenina/g ES) presentes en los EET. Para la implementación de la metodología, los EETs fueron analizados a distintas concentraciones, siendo la concentración final seleccionada de 7000ppm.

3.3.2.1 Protocolo del ensayo

- a) Para construir la curva de calibración, se utilizó el patrón de naringenina. La solución preparada, de concentración 2,075 mg/mL, se diluyó para obtener soluciones de 1,5; 1,0; 0,5 y 0,25 mg/mL (rango de concentración entre 0,42 y 8.64 $\mu\text{g/mL}$ en la microplaca). Los EETs se analizaron a una concentración de 7,0 mg/mL
- b) En un tubo de ensayo adecuadamente etiquetado, se procedió a agregar 1 mL de solución de cada uno de los EETs o del patrón, más 2 mL de solución de 2,4 DNP (Preparada pesando 1 g del reactivo 2,4 DNP, agregando 2 mL de H_2SO_4 y se aforando a 100 mL con metanol) y 2 mL de metanol (volumen final = 5 mL).
- c) Los tubos preparados se sellaron con parafilm y se llevaron a un baño termo regulado a 50° C por 50 min.
- d) Pasados los 50 min, se retiraron los tubos del baño y se dejaron enfriar a temperatura ambiente.
- e) Luego, se agregó 5 mL de solución de KOH al 10% en metanol a cada tubo preparado, incubando a temperatura ambiente por 2 min (volumen final = 10 mL).
- f) Se tomó 1 mL de cada tubo, se depositó en un segundo tubo de ensayo correctamente etiquetado, y se diluyó con 5 mL de metanol (volumen final = 6 mL).
- g) Estos tubos se centrifugaron a 1000 x g por 10 min.

- h) Una vez terminada la centrifugación, se tomó 1 mL del sobrenadante de cada tubo, llevando este volumen a un 3er tubo de ensayo, donde se diluyó con 3 mL de metanol (volumen final = 4 mL).
- i) Finalmente se tomó un volumen de 300 µL desde cada tubo, los que se depositaron en una microplaca Brand® de 96 pocillos, y se procedió a realizar la lectura a 495 nm en un lector de microplaca Thermo scientific®, modelo Multiskan GO. El análisis de muestras y patrones se realizó en triplicado.

3.3.3 Ensayo de la cinética del apagamiento del DPPH• y determinación de la capacidad y eficiencia antioxidante de los EETs de los genotipos de murtila

El radical DPPH, de profundo color púrpura, es uno de los pocos radicales orgánicos nitrogenados estables que está disponible comercialmente (Prior *et al*, 2005). El ensayo del apagamiento del radical DPPH, es un ensayo espectrofotométrico (a 517 nm) que se basa en la disminución de la absorbancia debido a la pérdida de color de este radical cuando es reducido luego de añadir una sustancia antioxidante. La disminución en la absorbancia es proporcional a la concentración y capacidad antioxidante del o los compuestos en estudio (Villaño *et al*, 2007). Como sustancia de referencia se utilizó la quercetina.

3.3.3.1 Reactivos

- a) Solución del radical DPPH: Se preparó semanalmente una solución stock de DPPH• a una concentración de 0,125 mg/mL. Para esto se pesaron 12,5 mg de DPPH• en un matraz de 100 mL y se aforó con metanol. Esta solución se mantuvo a baja temperatura (-20°C) y protegida de la luz. Para cada medición se utilizó una solución de DPPH• de una concentración de 0,40 mg/mL, para esto se tomaron 3,2 mL de la solución stock y se aforó con metanol en un matraz de 10 mL.

- b) Quercetina: Se preparó una solución metanólica de quercetina en las siguientes concentraciones: 60; 40; 30; 20 y 10 ppm. Para esto, previamente se preparó una solución madre de quercetina a 500ppm pesando 10 mg en un matraz de 20 mL aforando con metanol. Esta solución se diluyó para conseguir las concentraciones antes mencionadas. Las concentraciones finales en la microplaca son: 5,8; 3,9; 2,9; 1,9 y 0,96ppm.
- c) Muestras: Se prepararon soluciones madres de concentración 200ppm de cada EET de murtila con metanol, las cuales se diluyeron a las siguientes concentraciones: 150; 100; 75; 60 y 40 mg/mL. Las concentraciones finales en la microplaca fueron: 14,4; 9,6; 7,2; 5,8 y 3,9ppm

3.3.3.2 Protocolo del ensayo

- a) Definir el diseño de los pocillos a ocupar en la microplaca. Se dispuso las muestras y los controles de la siguiente manera:

	1	2	3	4	5	6	7	8
a								
b		M1	M2	M3	M4	M5	C1	C2
c								

Donde:

- M1 a M5 corresponden a los EETs o a quercetina.
 - C1 y C2 corresponden a controles (metanol + DPPH●).
- b) En cada pocillo seleccionado se depositó 25 μ L de EET, quercetina, o metanol si es que correspondiera a un pocillo control.
- c) Luego, se adicionaron 235 μ L de DPPH 0,04 mg/mL en cada pocillo utilizando una micropipeta de 8 canales (volumen total = 260 μ L).
- d) Para evitar la evaporación del metanol se utilizaron sellos de poliolefina para microplaca de la marca Nunc™.

- e) Se midió a 517 nm cada 10 s, por un tiempo total de 90 min (540 lecturas).
Cada ensayo se realizó en triplicado.

El ensayo se llevó a cabo en un lector de microplaca Thermo scientific®, modelo Multiskan GO, controlado por el software SkanIt RE for Multiskan GO 3.2.

3.3.3.3 Determinación de la CE₅₀

La CE₅₀ corresponde a la concentración de antioxidante que se necesita para reducir la concentración de DPPH en un 50%, valor que es inversamente proporcional a la capacidad antioxidante del o los compuestos en estudio (Villaño et al, 2007). Para calcular el valor de CE₅₀ de los EETs de murtila y de la quercetina, se utilizaron los resultados obtenidos en el estudio cinético del atrapamiento del radical DPPH, con el fin de obtener el porcentaje de DPPH• remanente para cada concentración utilizada. El porcentaje de DPPH• remanente (%DPPHrem) se calculó de la siguiente manera:

$$\%DPPHrem = \left(\frac{Ac}{Af} \right) \times 100$$

Dónde:

- *Ac* corresponde a la absorbancia del control (metanol + DPPH)
- *Af* corresponde a la absorbancia una vez terminado el ensayo

Así, una vez obtenidos los %DPPHrem, se procedió a graficar el %DPPHrem versus concentración de los EETs o de quercetina, para obtener por interpolación en la ecuación de la recta las CE₅₀ correspondientes.

3.3.3.4 Determinación del tiempo efectivo a la CE₅₀ (TEC₅₀)

El TEC₅₀ corresponde al tiempo necesario para que el antioxidante a la CE₅₀ llegue a una absorbancia constante (Sánchez-Moreno *et al*, 1997). Para determinar el TEC₅₀ se prepararon soluciones a la CE₅₀ de cada uno de los EETs en estudio y se determinó el tiempo en que cada uno de los EETs alcanzó una absorbancia constante durante 3 min.

3.3.3.5 Cálculo de la eficiencia antioxidante (EA).

Este parámetro fue propuesto por Sánchez-Moreno *et al* (1997) y toma en cuenta tanto la CE₅₀ como el TEC₅₀. Por lo tanto, este parámetro es más adecuado a la hora de clasificar un antioxidante que la EC₅₀, ya que la EA considera tanto la potencia como también la velocidad de reacción del antioxidante (Sanchez-Moreno *et al*, 1997). La eficiencia antioxidante (EA), entonces, se calcula de la siguiente manera:

$$EA = \frac{1}{CE_{50} \times TEC_{50}}$$

Dónde:

- EA corresponde a la eficiencia antioxidante
- CE₅₀ corresponde a la concentración efectiva 50
- TEC₅₀ corresponde al tiempo efectivo a la CE₅₀

3.3.4 Identificación y contenido de quercetina, rutina, ácido gálico y miricitrina de los EETs por CLAE-DAD

Los compuestos fenólicos a identificar y cuantificar, como quercetina, rutina y miricitrina han sido descritos previamente en hojas de murtila (Rubilar *et al*, 2006; Shene *et al*, 2012). Sin embargo, también se incluyó en este estudio al ácido gálico, compuesto polifenólico que no ha sido identificado previamente en la especie en estudio. Considerando que se ha descrito un derivado de este compuesto en un estudio previo (Rubilar *et al*, 2006) y debido a la disponibilidad de este patrón, se consideró su inclusión en este estudio.

La identificación y cuantificación de quercetina, rutina, miricitrina y ácido gálico se llevó a cabo un análisis mediante la técnica de CLAE-DAD de los EETs. Esta técnica posee una alta sensibilidad, reproducibilidad y capacidad de separación (Floriani *et al*, 2014). Estas características nos permitieron identificar y cuantificar algunos cuales de estos compuestos polifenólicos están presentes en los diferentes EETs a través del uso de los patrones respectivos y la construcción de curvas de calibración.

El análisis de los 10 EETs se llevó a cabo en un equipo CLAE Waters 486, acoplado a un detector UV/visible Waters con arreglo de diodos. Para determinar la presencia de compuestos polifenólicos, se realizó una detección a 360 nm y a 270 nm.

Las condiciones del análisis cromatográfico se escogieron de acuerdo a Michodjehoun-Mestres *et al* (2009), modificando solo la columna utilizada, y se muestran en las siguientes Tablas (Tabla 3 y 4):

Tabla 3: Condiciones cromatográficas para el análisis por CLAE-DAD

Columna	Purospher® STAR RP-18 endcapped (5µm) (MERCK)
Fase móvil A	Agua/Ácido fórmico (98/2)
Fase móvil B	Agua/Acetonitrilo/Ácido fórmico (18/80/2)
Flujo	0,5 mL/minuto
Volumen de inyección	20 µL
Longitud de onda	270 nm ; 360 nm

Tabla 4: Programa de elución de las fases móviles

Tiempo (min)	% Fase móvil A	% Fase móvil B
0	90	10
4	90	10
8	84	16
45	84	16
55	65	35
72	20	80
75	0	100
80	95	5
90	90	10

Los EETs se prepararon a una concentración de 7,0 mg/mL con metanol para CLAE-DAD y se almacenaron a -20° Celsius. Para esto, se pesaron 70 mg de cada EET en un matraz aforado de 10 mL, llevando a volumen con metanol para CLAE. Las muestras fueron filtradas a través de un filtro Microsphere de 0,22 µm directamente a un vial para luego ser analizadas.

3.4 Análisis estadístico

El análisis estadístico de los resultados experimentales se realizó mediante el test ANOVA de una vía con ensayo de comparaciones múltiples de Tukey, utilizando el software GraphPad Prism® para Windows versión 6.01.

Las correlaciones entre contenido de flavanonas, quercetina, rutina, ácido gálico vs actividad antioxidante fueron determinadas mediante el cálculo de coeficiente de Pearson (r).

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1 Extracción del material vegetal

A continuación, en la Tabla 5 se muestran los resultados de los rendimientos obtenidos para los extractos seriados de hexano, diclorometano, acetato de etilo y etanol.

Tabla 5. Rendimientos de los extractos seriados

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

El genotipo que obtuvo el mejor rendimiento fue el genotipo 19-1 (16,39%), mientras que el genotipo 31-1 fue el que obtuvo el rendimiento más bajo con un 8,49%.

4.2 Análisis Químico

4.2.1 Análisis químico-cualitativo de los extractos de murtila por CCF

En la figura 6 se pueden apreciar los análisis por CCF de los EETs de murtila, utilizando quercetina, rutina y ácido gálico como patrones. En la imagen a) se puede observar que los patrones de quercetina y ácido gálico corrieron con el frente de solvente y las manchas son difíciles de distinguir en los EETs. Es por esto que la fase móvil ocupada en a) se modificó agregando DCM y quitando el HCOOH, pudiendo así separar y apreciar de mejor manera las manchas de quercetina y ácido gálico, como se puede ver en la imagen b).

La mancha de quercetina es de un color amarillo bastante fuerte y brillante en ambas cromatografías. Su R_f en la cromatografía b) fue igual a 0,87. Con esta información fue posible comparar el patrón con las muestras, identificándose la presencia probable de quercetina en 7 de los 10 EETs en la cromatografía b). El ácido gálico obtuvo un R_f de 0,68 en la cromatografía b), con una mancha de color azul, la cual fue posible identificar en 9 de los 10 EETs.

En la cromatografía a), rutina obtuvo una mancha de color amarillo opaco, a diferencia del color anaranjado de la cromatografía b).

En las condiciones de la cromatografía b) la rutina no corrió con el solvente utilizado, quedando en la base del cromatograma, esto no ocurrió en la cromatografía a). El R_f obtenido por rutina en la cromatografía a) fue de 0,53, R_f que no coincide con ninguna mancha presente en las muestras de murtila. Cabe mencionar que se ven manchas en los EETs de color similar a la rutina pero a un R_f de 0,65 por lo que no podemos establecer presencia probable de rutina.

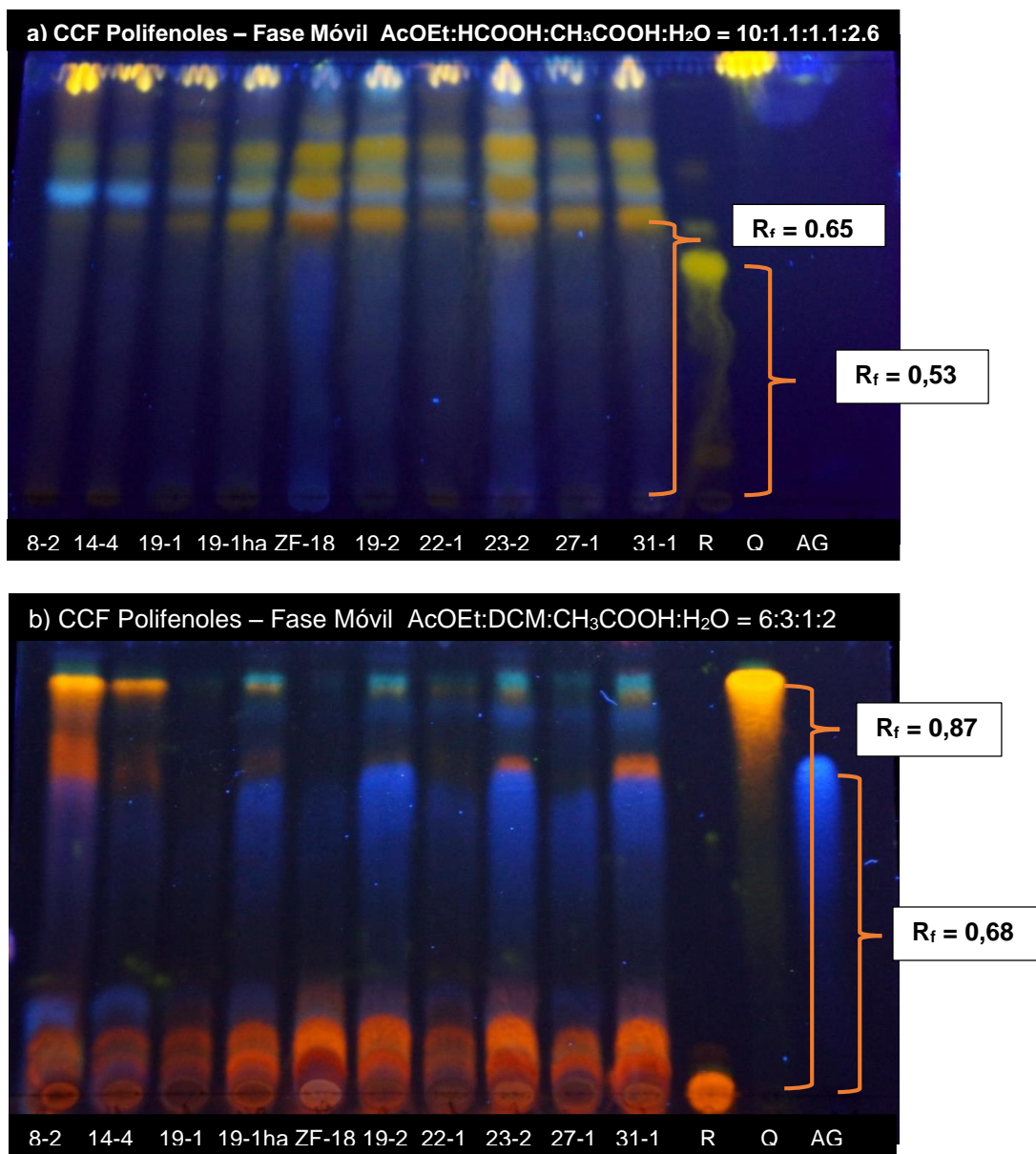


Figura 6. Cromatografías en capa fina de los extractos de murtilia

4.2.2 Cuantificación de flavanonas totales mediante el ensayo colorimétrico con 2,4 DNP de los EETs de los genotipos de murtila

Las flavanonas corresponden a un tipo de flavonoides que hace un par de décadas eran considerados como minoritarios. Sin embargo, en los últimos 15 años, el número total de flavanonas conocidas ha aumentado de tal manera que ahora son consideradas una clase importante de flavonoides (Khan *et al*, 2014). En la Figura 7 se muestra la curva de calibración para la cuantificación de flavanonas. En la Tabla 6 se muestran los resultados obtenidos.

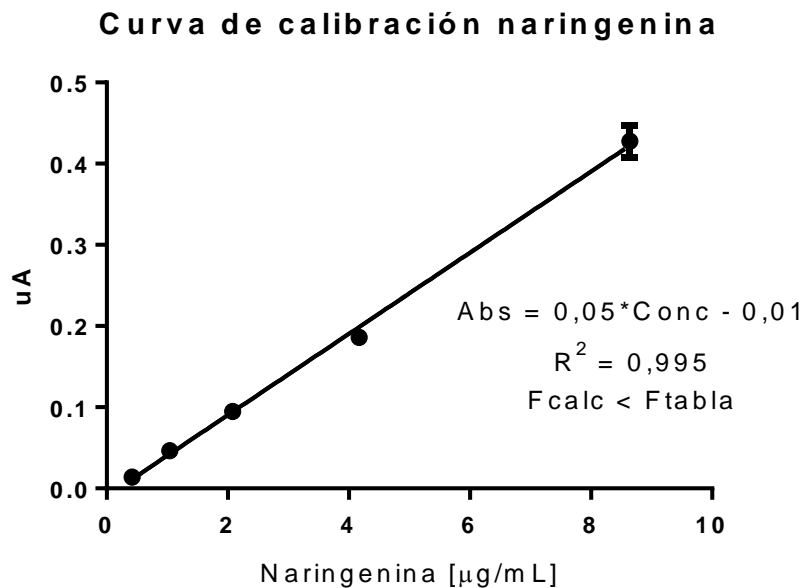


Figura 7. Curva de calibración de naringenina para la cuantificación de flavanonas

Tabla 6. Contenido y porcentaje p/p de flavanonas en los EETs de murtila

Genotipo	Contenido de flavanonas (mg naringenina/g ES) \pm DS*	% Flavanonas \pm DS*
EET 8-2	77,9 \pm 1,4	7,8 \pm 0,1 ^a
EET 14-4	67,0 \pm 2,2	6,7 \pm 0,2 ^{b,d}
EET 19-1	52,5 \pm 1,0	5,3 \pm 0,1 ^c
EET 19-1 ^{ha}	62,7 \pm 3,1	6,3 \pm 0,3 ^d
EET 19-2	42,9 \pm 0,6	4,3 \pm 0,1 ^e
EET 22-1	62,5 \pm 3,2	6,3 \pm 0,3 ^{b,d}
EET 23-2	77,5 \pm 4,0	7,8 \pm 0,4 ^a
EET 27-1	57,9 \pm 0,7	5,8 \pm 0,1 ^{c,d}
EET 31-1	35,5 \pm 0,8	3,6 \pm 0,1 ^f
EET ZF-18	52,6 \pm 2,5	5,3 \pm 0,3 ^c

- * Todos los resultados están expresados como el promedio de un triplicado \pm desviación estándar.

- Misma letra (a, b, c, d, e, f) en cada columna representa valores que no son estadísticamente diferentes ($p > 0,05$) por el test de comparaciones múltiples de Tukey.

Los resultados obtenidos para ensayo del 2,4 DNP se presentan en la Tabla 6. Entre los EETs de murtila, el que obtuvo el menor porcentaje de flavanonas fue el EET del genotipo 31-1, con un 3,6 \pm 0,1% de flavanonas. Los EETs de los genotipos 8-2 y 23-2 fueron los que obtuvieron un mayor porcentaje de flavanonas con un 7,8 \pm 0,1% y un 7,8 \pm 0,4% respectivamente, valores que no fueron estadísticamente diferentes entre sí, pero si en relación a los demás genotipos estudiados.

Debido a que los 10 genotipos de murtila analizados en este estudio fueron cultivados bajo las mismas condiciones por el INIA en Carillanca, las diferencias que se presentan en el contenido de flavanonas de los extractos, calculado a través del método del 2,4 DNP, se deberían a las diferencias en sus genotipos.

En estudios previos realizados en extractos de hojas de murtila, no se había informado la presencia de flavanonas, por lo tanto este estudio es una contribución al conocimiento de los compuestos fenólicos presentes en las hojas de murtila.

4.2.3 Determinación de la capacidad y eficiencia antioxidante mediante el ensayo de cinética del radical DPPH.

Con el fin de evaluar la actividad antioxidante de los EETs de murtila, se llevó a cabo un estudio de la cinética de atrapamiento del radical DPPH (Figura 8), pudiendo realizar una comparación entre la capacidad antioxidante de los diferentes genotipos. Se observó un comportamiento cinético similar para todos los genotipos de murtila, en el que se pueden diferenciar 3 fases una vez concluidos los 90 min del ensayo: una inicial, de velocidad rápida; una intermedia, de velocidad media y una fase final de velocidad lenta.

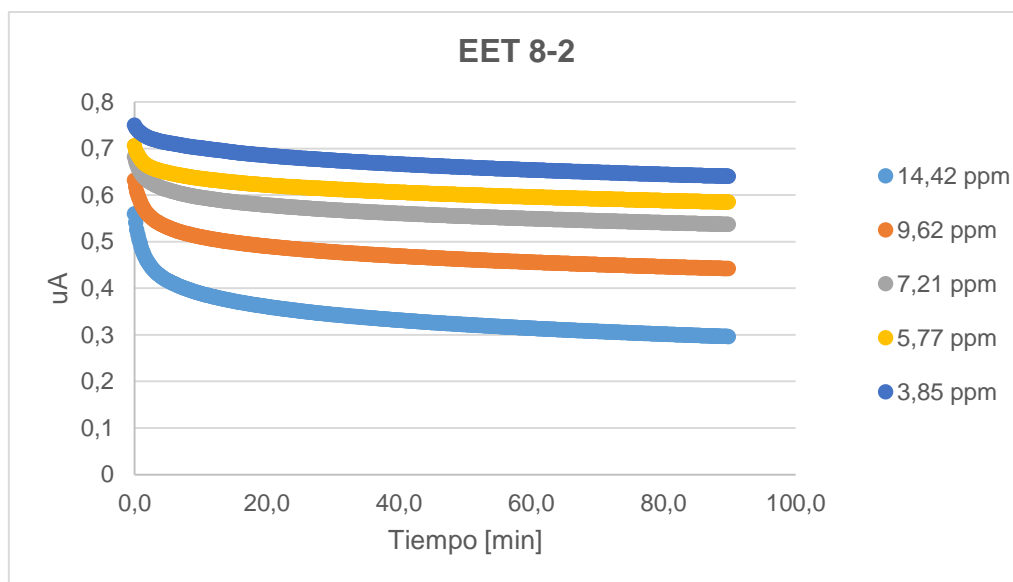


Figura 8. Cinética de neutralización del DPPH• por el EET 8-2

4.2.3.1 Determinación de las CE_{50} , TEC_{50} y EA

Una vez completados los 90 min del ensayo, se calcularon los %DPPHrem, tanto de los EETs como de la quercetina, y se graficaron versus la concentración (Figura 9). De estos gráficos se obtuvieron, mediante regresión lineal, las ecuaciones de la recta respectivas y por interpolación, la CE_{50} de cada genotipo y de los patrones. Las ecuaciones de la recta se informan en la Tabla 7.

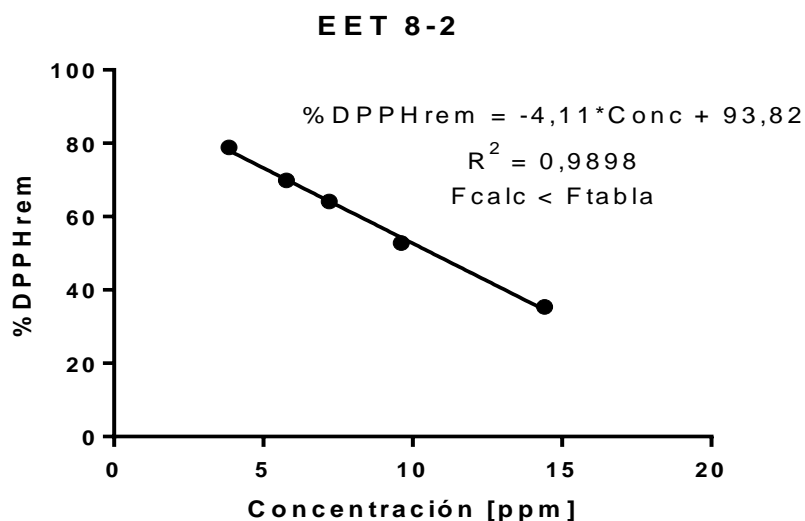


Figura 9. Gráfico de %DPPHrem vs concentración para el EET 8-2

Tabla 7. Ecuaciones de la recta con su coeficiente de determinación, F calculado y F de tabla obtenidas desde los gráficos de %DPPHrem vs concentración de EET

Genotipos de Murtila	Ecuación de la recta	R ²	F calculado	F de tabla
EET 8-2	Y = -4,111*X + 93,82	0,9898	1,6	3,7
EET 14-4	Y = -4,341*X + 96,56	0,9932	0,7	3,7
EET 19-1	Y = -4,307*X + 95,78	0,9887	0,1	3,7
EET 19-1 ^{ha}	Y = -3,492*X + 94,35	0,9858	0,9	3,7
EET 19-2	Y = -3,572*X + 93,30	0,9846	1,7	3,7
EET 22-1	Y = -4,203*X + 93,11	0,9906	1,7	3,7
EET 23-2	Y = -4,090*X + 93,20	0,9960	4,8	3,7
EET 27-1	Y = -4,140*X + 92,92	0,9946	6,4	3,7
EET 31-1	Y = -3,961*X + 94,60	0,9917	4,8	3,7
EET ZF 18	Y = -4,516*X + 91,96	0,9699	1,3	3,7
Quercetina	Y = -14,08*X + 95,11	0,9855	0,4	3,7

Una vez obtenidas las CE_{50} de los 10 genotipos, se procedió a determinar el TEC_{50} . A continuación, en la Figura 10, se muestra el gráfico de absorbancia versus tiempo del EET 8-2 a la EC_{50} . El TEC_{50} para este genotipo fue $63,1 \pm 0,6$.

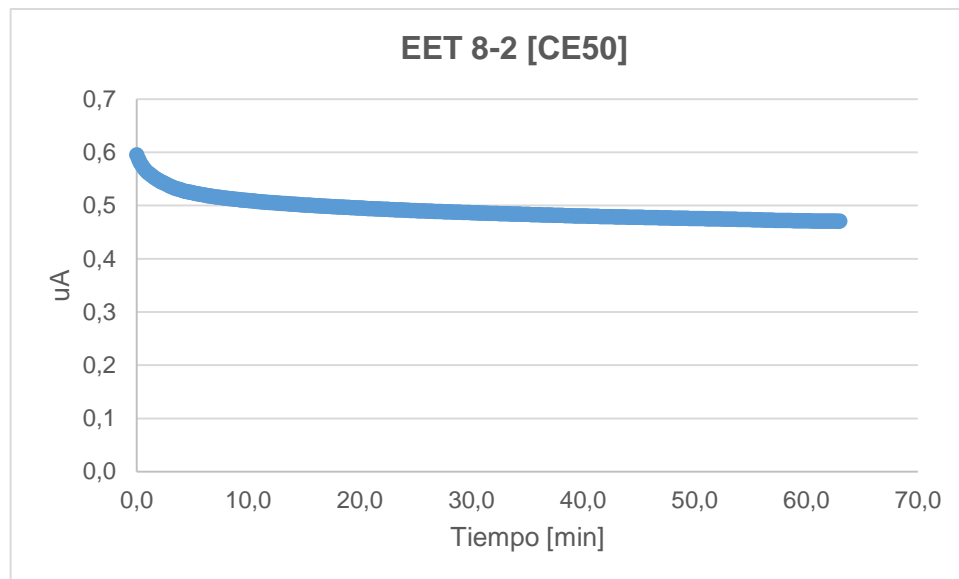


Figura 10. Gráfico de la cinética de neutralización del radical DPPH por el EET 8-2 a la CE_{50}

Los valores de las CE_{50} , TEC_{50} y EA de los 10 genotipos de murtila analizados en este estudio, y de los patrones, se presentan resumidos a continuación en la Tabla 8. Los gráficos de cinética de atrapamiento del radical DPPH, %DPPHrem vs concentración y TEC_{50} muestran en el Anexo 2.a, 2.b y 2.c respectivamente.

Tabla 8. CE₅₀, TEC₅₀ y EA de los EETs de los 10 genotipos de murtila y de quercetina

Genotipos de murtila	CE ₅₀ [ppm] ± DS*	TEC ₅₀ ± DS [min]*	EA [x 10 ⁻³] ± DS*
EET 8-2	10,7 ± 0.4 ^{a,d}	63,1 ± 0,6 ^a	1,49 ± 0,06 ^a
EET 14-4	10,5 ± 0.1 ^{a,c,d}	43,9 ± 0,9 ^b	2,12 ± 0,03 ^b
EET 19-1	11,0 ± 0.7 ^{a,d}	74,5 ± 0,2 ^{c,e,f}	1,21 ± 0,01 ^c
EET 19-1 ^{ha}	12,6 ± 0.7 ^b	75,2 ± 0,5 ^{c,f}	1,05 ± 0,05 ^d
EET 19-2	12,3 ± 0.6 ^b	58,8 ± 1,2 ^d	1,40 ± 0,08 ^a
EET 22-1	10,3 ± 0.3 ^{a,c}	71,7 ± 0,5 ^e	1,36 ± 0,03 ^{a,c}
EET 23-2	10,7 ± 0.3 ^{a,d}	65,7 ± 1,2 ^a	1.44 ± 0,05 ^a
EET 27-1	10,4 ± 0.2 ^{a,c,d}	72,3 ± 2,5 ^{e,f}	1,33 ± 0.03 ^{a,c}
EET 31-1	11,6 ± 0.2 ^{b,d}	59,8 ± 0,8 ^d	1,48 ± 0,04 ^a
EET ZF 18	9,3 ± 0.6 ^c	75,6 ± 0,6 ^c	1,43 ± 0,10 ^a
Quercetina	3,2 ± 0.2 ^e	65,0 ± 1,3 ^a	4,89 ± 0,64 ^e

- * Los resultados se expresan como el promedio de un triplicado ± desviación estándar.
- Misma letra (a, b, c, d, e, f) en cada columna representa valores que no son estadísticamente significativos (p > 0,05) por el test de comparaciones múltiples de Tukey.

La EA comprende tanto la habilidad de los compuestos para donar electrones o átomos de hidrógeno, como la velocidad de los compuestos para neutralizar los radicales libres. Así, los compuestos que tengan una menor CE₅₀ y un menor TEC₅₀, es decir, aquellos que sean más potentes y actúen de forma más rápida, serán los que tengan una mayor EA (Sánchez-Moreno *et al*, 1998).

Como podemos apreciar en la Tabla 8, el EET que obtuvo la mayor EA fue el EET del genotipo 14-4, con un valor de 2,12x10⁻³ ± 0.03. Este valor fue estadísticamente mayor (p < 0,05) que los valores obtenidos para los demás genotipos analizados. El EET 14-4 no fue el extracto que obtuvo la menor CE₅₀, pero si obtuvo el menor TEC₅₀ (43,9 ± 0,9 minutos), entre todos los genotipos y

también menor al TEC_{50} de la quercetina ($65,0 \pm 1,3$), por lo que podríamos inferir que los compuestos presentes en el genotipo 14-4 reaccionan de manera más rápida con el radical DPPH que los presentes en los demás genotipos estudiados. Las CE_{50} y las EA de todos los genotipos no fueron mejores que las de quercetina.

El EET del genotipo 19-1_{ha}, posee la CE_{50} más alta entre todos los extractos ($12,6 \pm 0,7 \mu\text{g/mL}$) y también uno de los TEC_{50} más altos ($75,2 \pm 0,5$ minutos). Debido a esto su EA es la más baja entre los 10 genotipos en estudio, con un valor de $1,05 \times 10^{-3} \pm 0,05$. Por lo tanto el EET 19-1_{ha} es el genotipo que es menos eficiente como antioxidante. Esto podría deberse a que posee una baja concentración de compuestos polifenólicos en comparación a los demás EETs (Figura 15) y además, el EET de este genotipo posee un 6,3% de flavanonas totales, compuestos polifenólicos que no son efectivos a la hora de actuar frente al radical DPPH, en relación a las flavonas y flavonoles (Tabart *et al*, 2009).

4.2.3.2 Comparación entre EA, CE₅₀ y % de flavanonas

En la Figura 11, se presentan los resultados obtenidos para la EA y el % de flavanonas de los 10 genotipos de murtila. Al comparar la EA con el porcentaje de flavanonas calculado a través del método del 2,4 DNP, podemos apreciar que no existe una relación entre la cantidad de flavanonas y la actividad antioxidante de los diferentes extractos de murtila.

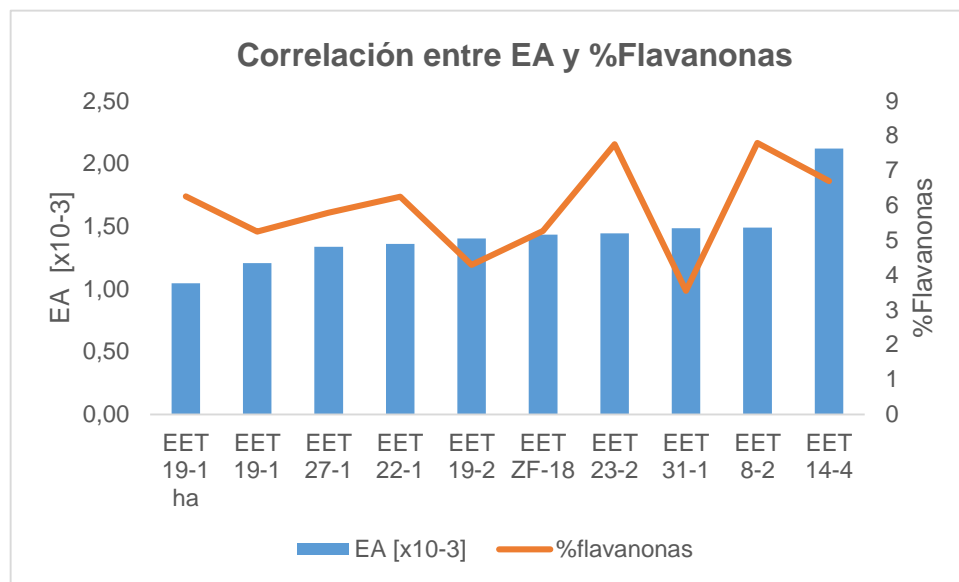


Figura 11. Correlación entre la EA y el %flavanonas presentes en los EETs de murtila

A continuación se presenta el gráfico de % de flavanonas vs AE (Figura 12). Este gráfico refleja de mejor manera, a través del coeficiente de Pearson, que no existe una correlación entre la cantidad de flavanonas y la eficiencia antioxidante de los EETs.

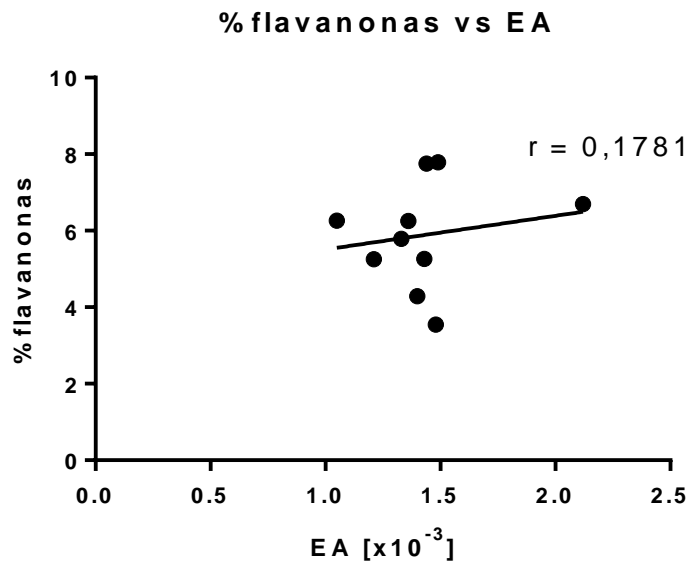


Figura 12. Gráfico comparativo de % de flavanonas vs EA

Tampoco existe una relación entre la CE_{50} y el contenido de flavanonas totales de los EETs, como se puede apreciar en los gráficos que se muestran a continuación (Figuras 13 y 14).

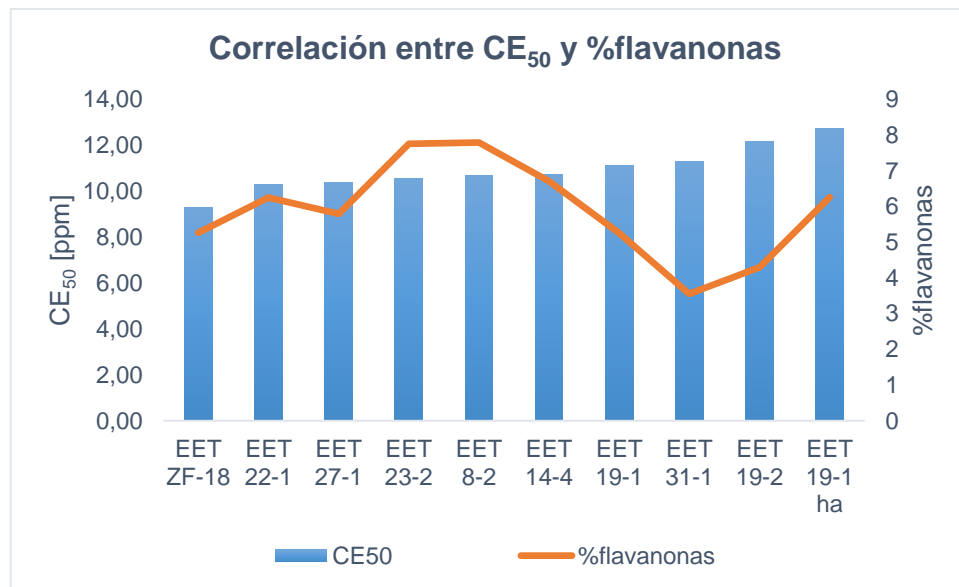


Figura 13. Correlación entre la CE_{50} y el % de flavanonas

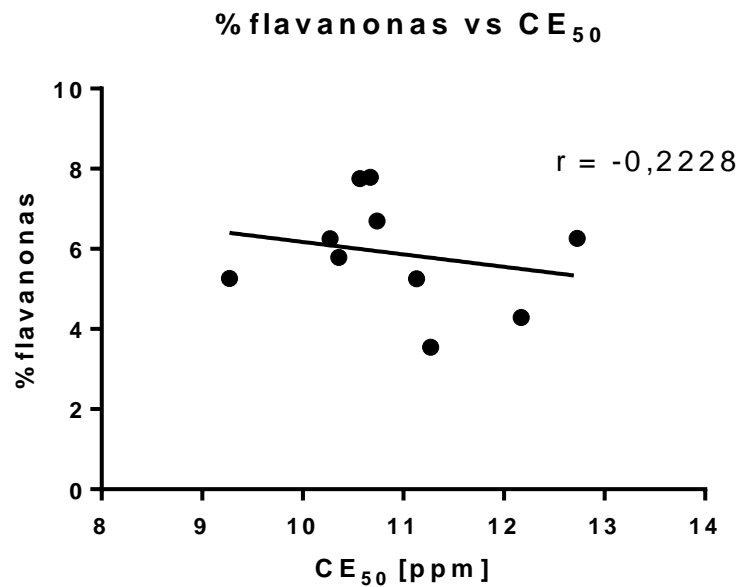


Figura 14. Gráfico comparativo de %flavanonas vs CE₅₀

Por lo tanto, se puede inferir que las flavanonas presentes en las hojas de murtila no contribuyen a la capacidad de neutralizar el radical DPPH de los EETs estudiados. Estos resultados concordarían con los presentado en el estudio de Tabart *et al*, en el 2009, donde las flavanonas hesperidina y naringenina no presentaron actividad antioxidante al ser estudiadas con el método del radical DPPH (Tabart *et al*, 2009).

4.2.3.3 Comparación entre el contenido fenólico, la EA y la CE₅₀.

En una tesis paralela realizada en el Laboratorio de Productos Naturales de la Universidad de Chile, se analizó la cantidad de compuestos fenólicos, expresados como equivalentes de ácido gálico (EAG), presentes en los 10 genotipos de *Ugni molinae* a través de la técnica de Folin-Ciocalteu. Este método se basa en la capacidad de un reactivo molibdotungstosfórico, de color amarillo, de oxidar a los compuestos fenólicos, formando un complejo de color azul con un máximo de absorbancia que puede ser medido espectrofotométricamente (Cicco *et al*, 2009).

A continuación, en las Figuras 15 a la 18, se expone la comparación entre los resultados obtenidos para el contenido de compuestos fenólicos, La EA y la CE₅₀ de los 10 extractos de murtila estudiados.

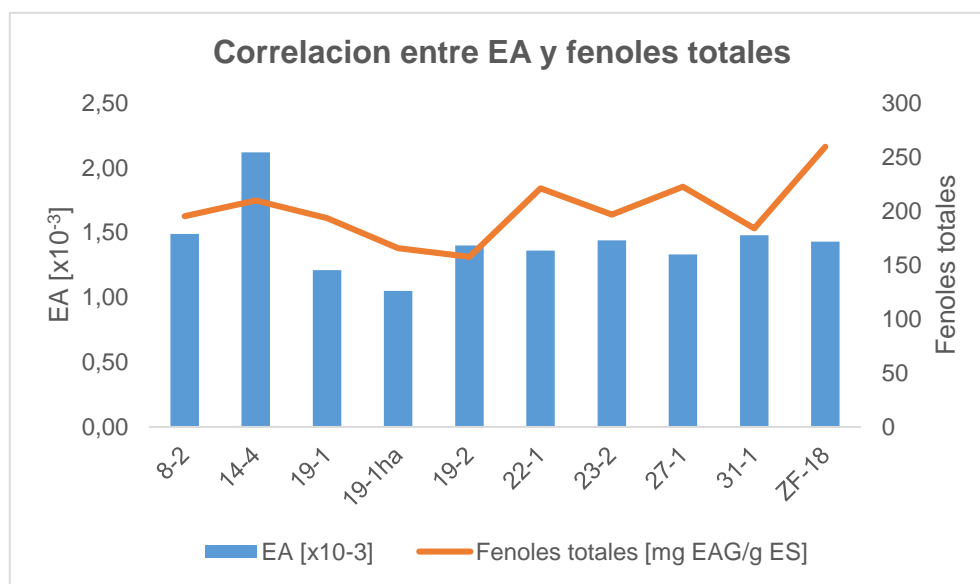


Figura 15. Correlación entre la eficiencia antioxidante y los fenoles totales de los extractos de murtila

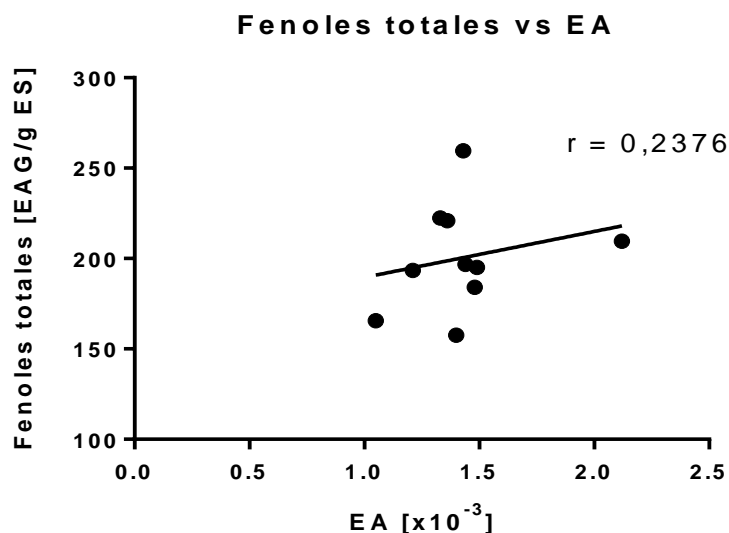


Figura 16. Gráfico comparativo de fenoles totales vs EA

Como podemos apreciar en las Figuras 15 y 16, no existe una relación directa entre la cantidad de fenoles presentes en los EETs de murtila y la eficiencia antioxidante de estos extractos.

También se realizó la comparación entre el contenido de compuestos fenólicos y la CE_{50} de los EETs, resultados que se exponen a continuación en las Figuras 17 y 18.

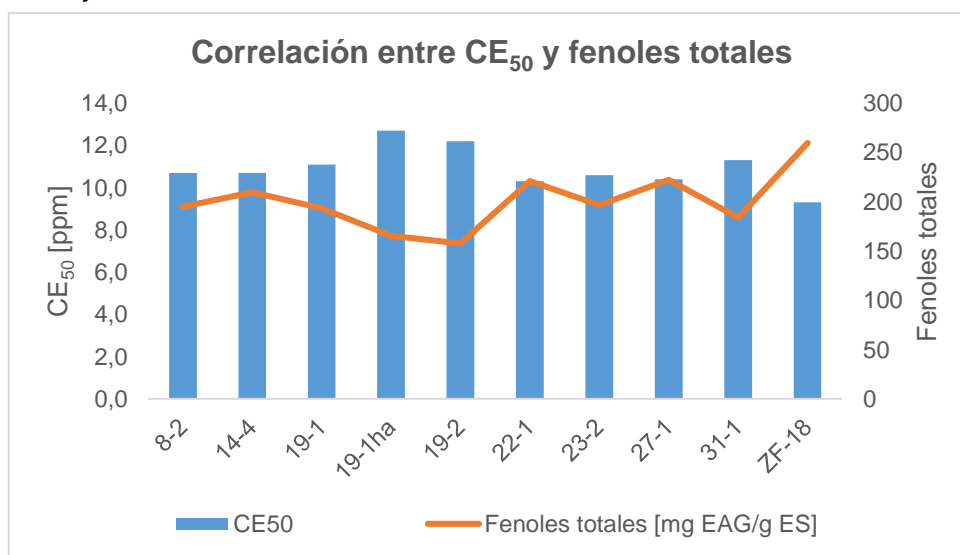
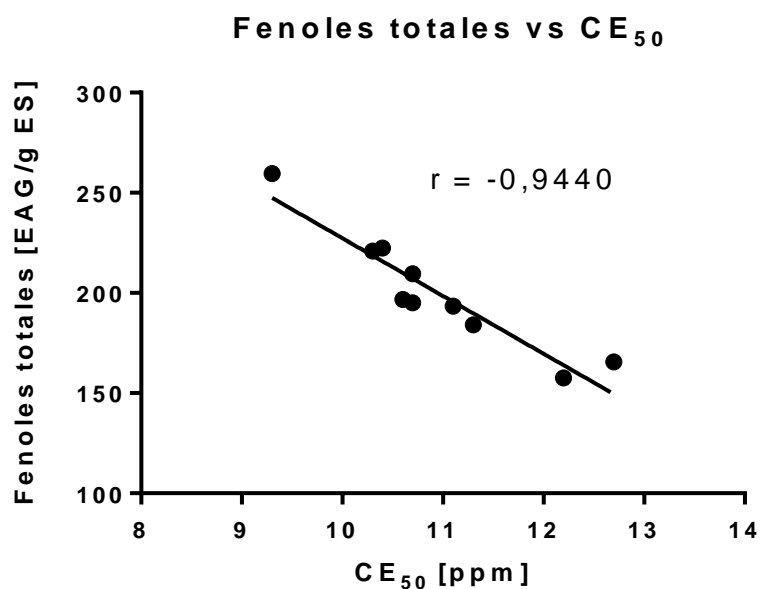


Figura 17. Correlación entre la CE_{50} y el contenido fenólico de los extractos de murtila



- **Figura 18.** Gráfico comparativo de contenido fenólico vs la CE₅₀.

Como se puede observar en la Figura 18, existe una relación inversa entre la cantidad de fenoles de los extractos y su CE₅₀ ($r = -0,9440$), es decir, a mayor contenido de fenoles, menor es la CE₅₀. A su vez, la CE₅₀ se relaciona de manera inversa a la capacidad antioxidante de los extractos (Villaño *et al*, 2007), lo que nos permite afirmar que mientras mayor sea el contenido fenólico de los EET, mayor será su capacidad antioxidante.

Mientras si existe una relación entre los valores obtenidos para la CE₅₀ y el contenido de compuestos fenólicos, esto no sucede para la EA de los extractos. Esto puede deberse a que la EA considera tanto la CE₅₀, como el tiempo (TEC₅₀) en que se apaga el 50% del radical DPPH y por lo tanto la EA incluye la velocidad con la que los compuestos reaccionan con los radicales libres.

4.2.4 Análisis de los EETs de los genotipos de murtila mediante CLAE-DAD

Diversos compuestos polifenólicos se han identificado en las hojas de murtila. Entre ellos destacan variados glucósidos de flavonoles, tales como los ramnósidos, glucósidos y xilósidos de quercetina y miricetina, glucósidos de canferol y también epicatequina (Rubilar *et al*, 2006; Shene *et al*, 2012).

A continuación, se expondrán los resultados obtenidos del análisis, mediante CLAE-DAD, de los 10 EETs de murtila. Mediante este análisis se pudo identificar y cuantificar quercetina, rutina (quercetina-3-O-Rutinósido) y ácido gálico. También se analizó el patrón miricitrina, el cual no fue identificado en ninguno de los EETs. El cromatograma a 360nm de miricitrina se muestra en el Anexo 3.b.

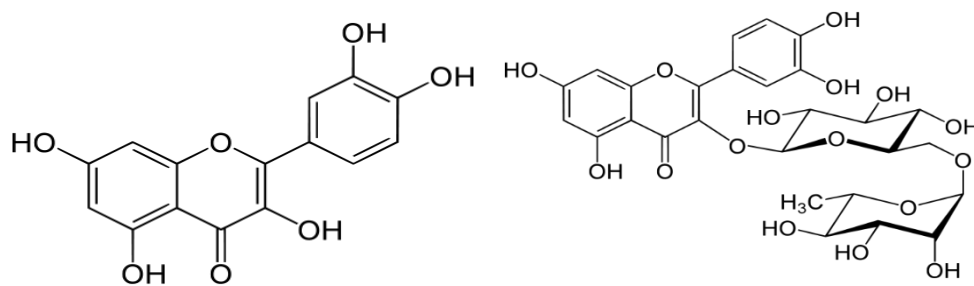


Figura 19. Estructuras de la quercetina y su 3-O-rutinosido (rutina)

4.2.4.1 Identificación y cuantificación de quercetina.

La identificación de quercetina en los EETs se realizó a través de la comparación del tiempo de retención a 360 nm y el espectro UV obtenido entre 200 y 400nm, con los del patrón. La quercetina tuvo un tiempo de retención (t_r) promedio de $73,4 \pm 0,1$ min y dos máximos de absorbancia a 254,1 nm y 366,9 nm. A continuación se presenta el cromatograma obtenido para la quercetina a 200 ppm y su respectivo espectro UV (Figura 20).

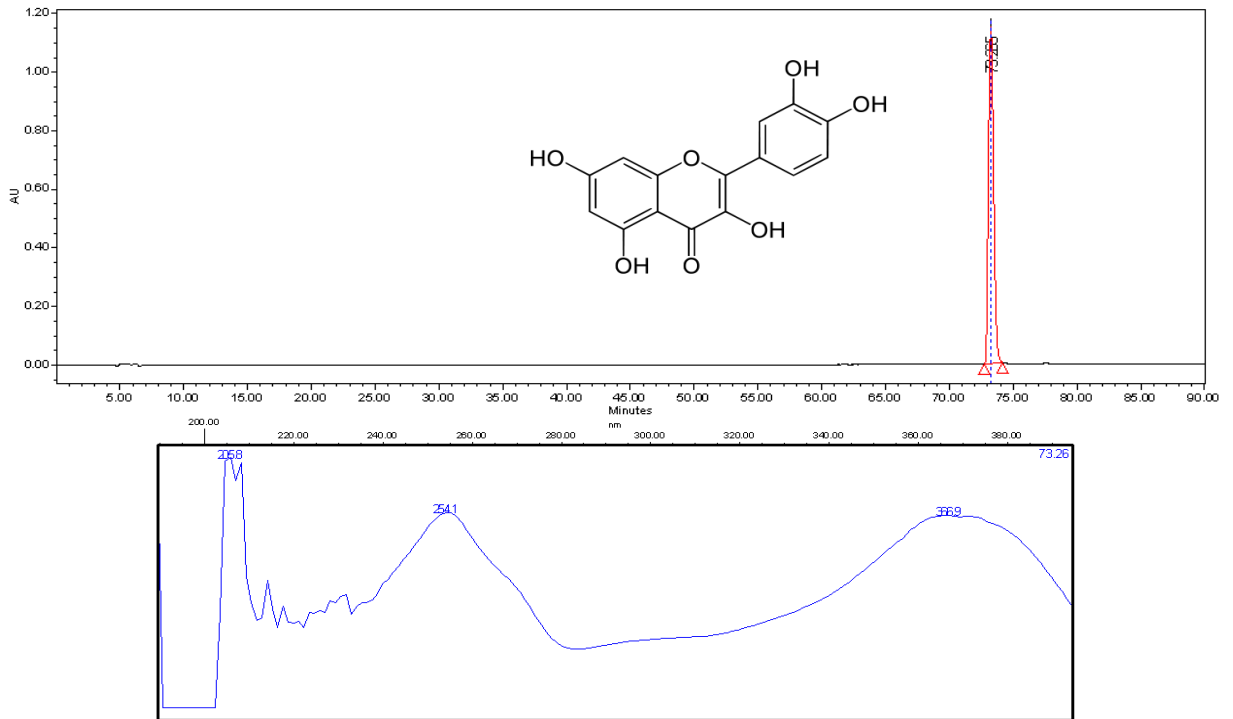


Figura 20. Cromatograma CLAE-DAD a 360 nm de quercetina

Todos los EETs presentaron quercetina. A continuación se muestra el cromatograma obtenido para el genotipo 14-4 (Figura 21). Los demás cromatogramas se muestran en el Anexo 3.b.

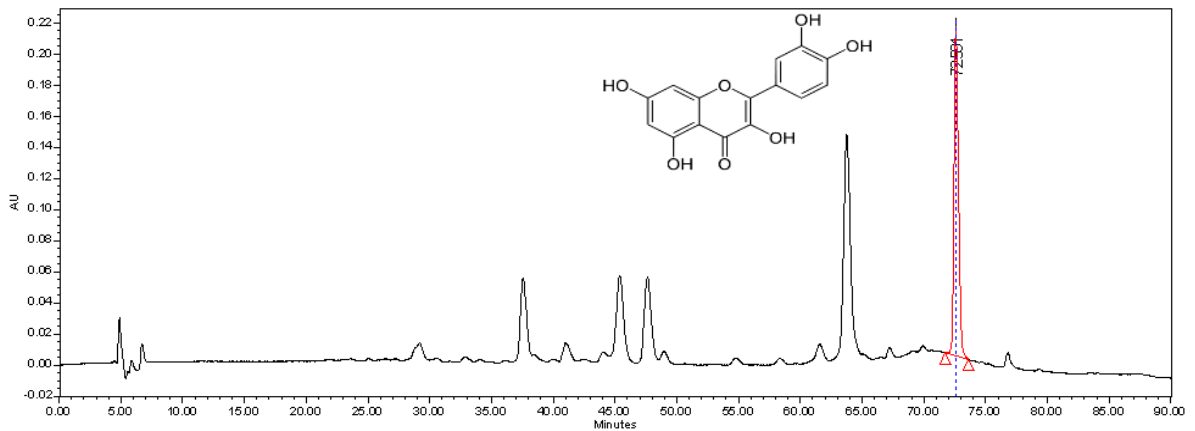


Figura 21. Cromatograma CLAE-DAD a 360 nm del EET del genotipo 14-4

Luego se construyó una curva de calibración (área del cromatograma vs concentración de quercetina) con las siguientes concentraciones del patrón: 10, 20, 50, 100, 150, y 200 ppm, la que se presenta en la Figura 22.

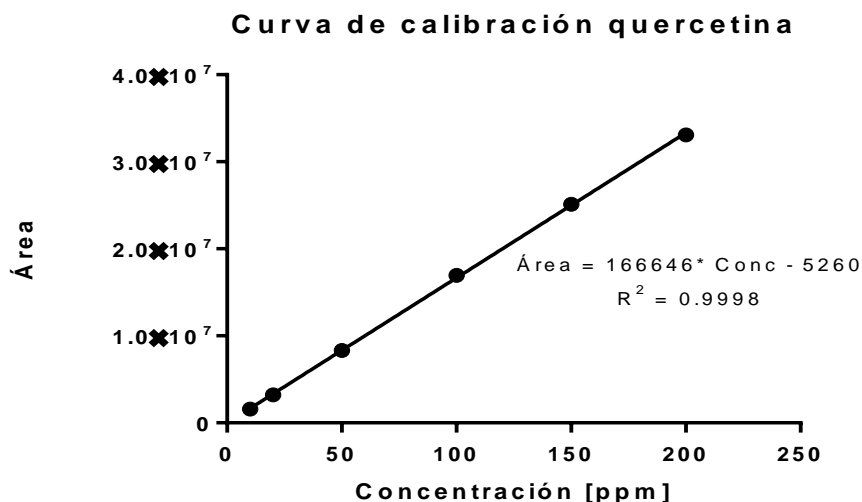


Figura 22. Curva de calibración de quercetina

Una vez obtenida la curva de calibración, se procedió a cuantificar quercetina en los 10 EETs de murtila. Los resultados obtenidos se muestran a continuación en la Tabla 9 y en la Figura 23.

Tabla 9. Contenido de quercetina en los 10 genotipos de murtila analizados

Genotipo	mg quercetina/g ES ± DS*
EET 8-2	8,98 ± 0,47 ^a
EET 14-4	4,21 ± 0,11 ^b
EET 19-1	1,50 ± 0,09 ^{c,e}
EET 19-1 _{ha}	0,89 ± 0,07 ^{c,d,f}
EET 19-2	0,66 ± 0,15 ^{d,f}
EET 22-1	1,73 ± 0,04 ^e
EET 23-2	1,18 ± 0,04 ^{c,d,e}
EET 27-1	0,80 ± 0,47 ^{d,f}
EET 31-1	0,87 ± 0,08 ^{c,d,f}
EET ZF-18	0,25 ± 0,09 ^f

- *Los resultados se expresan como el promedio de un triplicado ± su desviación estándar.
- Misma letra (a, b, c, d, e, f) en cada columna representa valores que no son estadísticamente significativos ($p > 0,05$) por el test de comparaciones múltiples de Tukey.

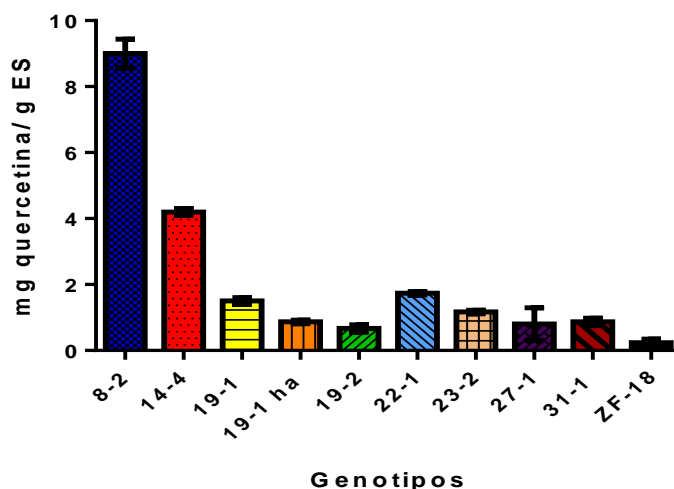


Figura 23. Contenido de quercetina en los 10 EETs de murtila

Como se puede apreciar tanto en la Tabla 9 como en la Figura 23, existen diferencias significativas ($p < 0,05$) entre la cantidad de quercetina presente en los genotipos de murtila estudiados. El EET genotipo 8-2 obtuvo la mayor cantidad de quercetina entre los extractos, con $8,98 \pm 0,47$ mg/g de ES, mientras que el EET del genotipo ZF-18 fue el que obtuvo la menor concentración con $0,25 \pm 0,09$ mg/gramo de ES, más de 30 veces menos que el EET del genotipo 8-2.

4.2.4.2 Identificación y cuantificación de rutina

La identificación de rutina en los EETs se realizó a través de la comparación de los t_r a 360 nm y del espectro UV obtenido entre 200 y 400 nm con los de la rutina patrón. La rutina presentó un tiempo de retención de $46,3 \pm 0,5$ min y dos máximos de absorbancia a 255,3 y 354,1 nm. El cromatograma obtenido para rutina y su respectivo espectro UV se muestran a continuación en la Figura 24.

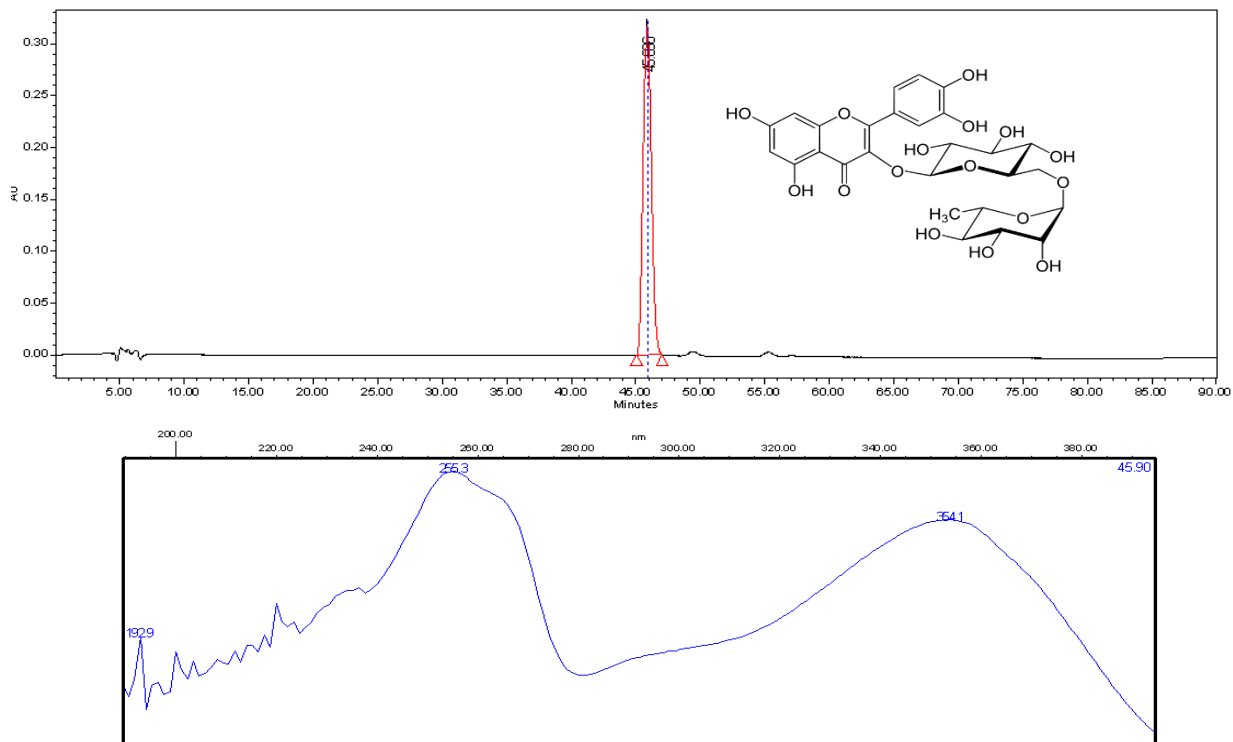


Figura 24. Cromatograma CLAE-DAD a 360 nm de rutina

Una vez obtenido el cromatograma de rutina, se procedió a compararlo con los cromatogramas obtenidos para los 10 EETs, pudiendo confirmar la presencia de rutina en 7 de los 10 genotipos de murtila. A continuación se muestra el cromatograma obtenido para el EET 23-2 (Figura 25). Los demás cromatogramas se muestran en el Anexo 3.

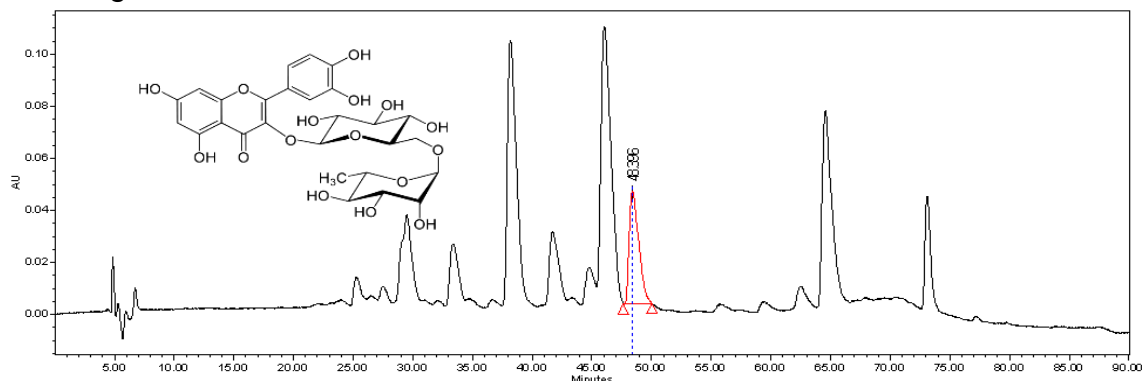


Figura 25. Cromatograma CLAE-DAD a 360 nm del EET del genotipo 23-2

Se construyó una curva de calibración (área vs concentración de rutina) con el patrón rutina a las siguientes concentraciones: 10, 20, 50, 100, 150, y 200 ppm (Figura 26).

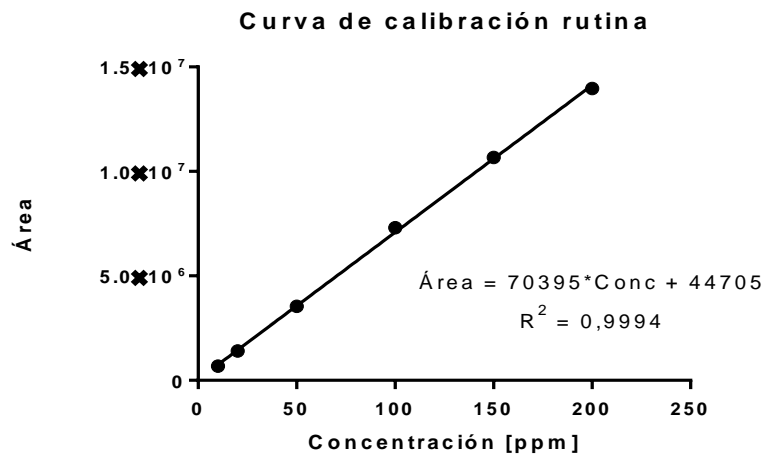


Figura 26. Curva de calibración de rutina

Utilizando esta curva de calibración, se cuantificó rutina en los 7 genotipos donde fue posible identificarla. Los resultados se muestran en la Tabla 10 y en la Figura 27.

Tabla 10. Contenido de rutina en los 10 genotipos de murtila analizados

Genotipo	mg rutina/g ES ± DS*
EET 8-2	2,30 ± 0,53 ^a
EET 14-4	3,84 ± 0,21 ^{a,b}
EET 19-1	7,27 ± 1,57 ^c
EET 19-1 _{ha}	0,00 ± 0,00
EET 19-2	7,32 ± 1,58 ^c
EET 22-1	5,51 ± 0,29 ^{b,c}
EET 23-2	4,63 ± 0,02 ^{a,b}
EET 27-1	0,00 ± 0,00
EET 31-1	0,00 ± 0,00
EET ZF-18	12,73 ± 0,14 ^d

- *Los resultados se expresan como el promedio de un triplicado ± su desviación estándar.
- Misma letra (a, b, c, d) en cada columna representa valores que no son estadísticamente significativos ($p > 0,05$) por el test de comparaciones múltiples de Tukey.

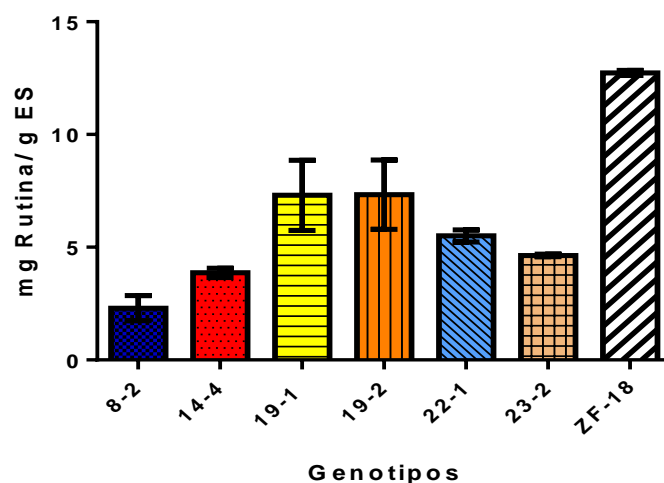


Figura 27. Contenido de rutina en los EET de murtila

Como podemos apreciar tanto en la Tabla 9 como en la Figura 27, Existen diferencias significativas ($p < 0,05$) entre las cantidades de rutina presentes en los distintos genotipos de murtila estudiados. Los EETs de los genotipos 19-1_{ha}, 27-1 y 31-1 no contienen rutina. El EET del genotipo ZF-18, al contrario de lo que sucede con su cantidad de quercetina, es el que presenta la mayor cantidad de rutina ($12,73 \pm 0,14$ mg/g ES). El EET del genotipo 8-2, que obtuvo la mayor cantidad de quercetina ($8,98 \pm 0,47$ mg/ g ES), fue el que obtuvo la menor cantidad de rutina ($2,30 \pm 0,53$ mg/g ES) entre los genotipos en los que se encuentra presente este heterósido.

4.2.4.3 Identificación y cuantificación de ácido gálico

La identificación de ácido gálico en los EETs se realizó comparando el t_r ($5,95 \pm 0,04$ min) a 270nm y el máximo de absorbanza entre 200 y 400 nm, con los del patrón ácido gálico. Fue posible identificar este compuesto en los 9 de los 10 genotipos de murtila estudiados. El cromatograma obtenido y su respectivo espectro UV se muestran a continuación (Figura 28).

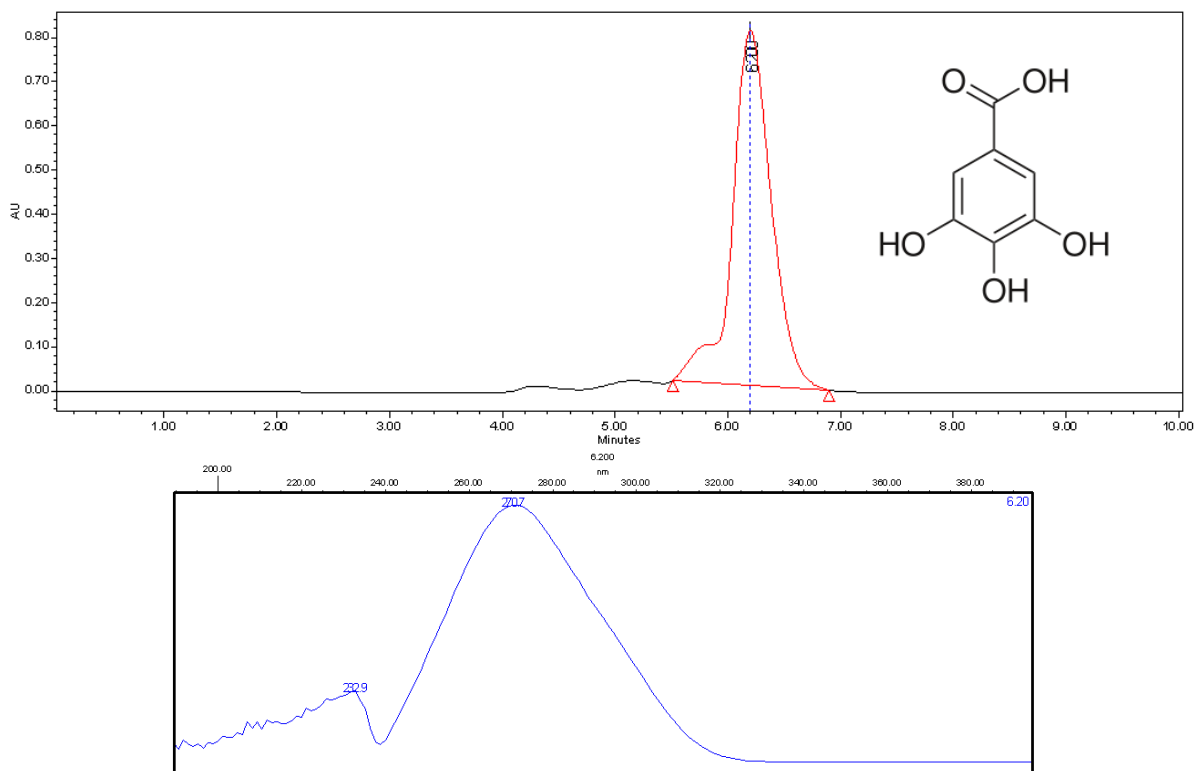


Figura 28. Cromatograma CLAE-DAD a 270nm de ácido gálico

Se construyó una curva de calibración con el patrón ácido gálico a las siguientes concentraciones: 10, 20, 50, 100, 150, y 200 ppm (Figura 29).

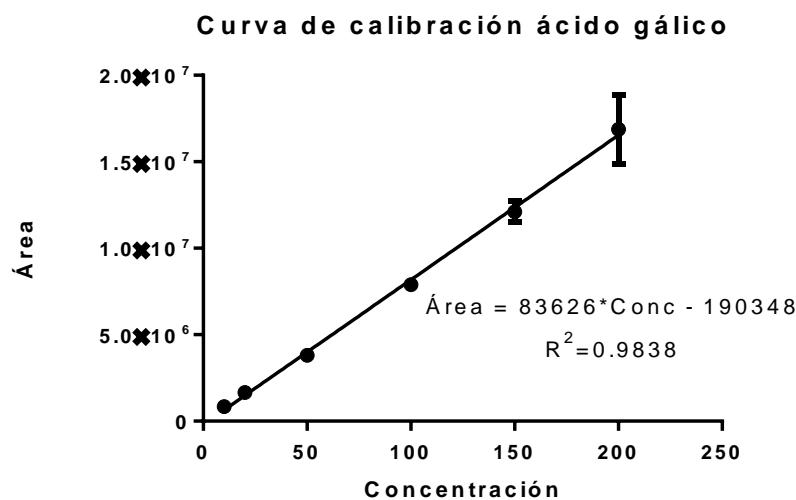


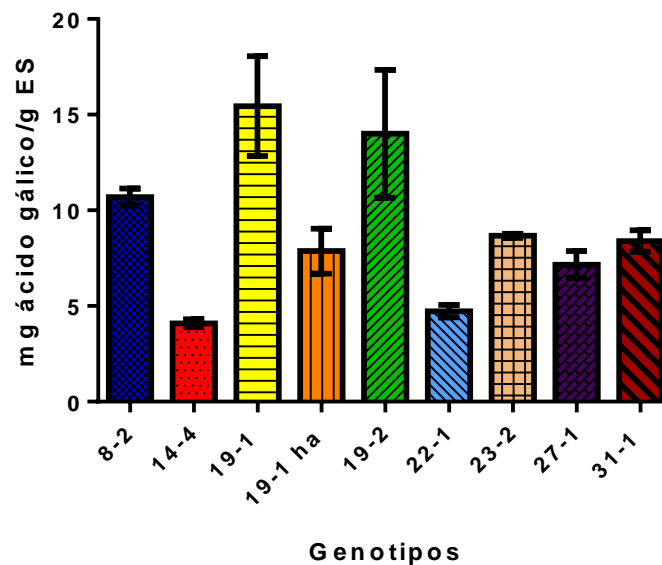
Figura 29. Curva de calibración de ácido gálico

Con la utilización de esta curva de calibración, se cuantificó ácido gálico en los 9 genotipos donde se pudo identificar, estos resultados se muestran a continuación en la Tabla 11 y en la Figura 30.

Tabla 11. Contenido de ácido gálico en los EETs de murtila

Genotipo	mg ácido gálico/g ES ± DS*
EET 8-2	10,72 ± 0,45 ^{a,d}
EET 14-4	4,08 ± 0,21 ^{b,e}
EET 19-1	15,44 ± 2,61 ^c
EET 19-1 _{ha}	7,88 ± 1,16 ^{a,b,e}
EET 19-2	13,99 ± 3,35 ^{c,d}
EET 22-1	4,71 ± 0,31 ^e
EET 23-2	8,68 ± 0,11 ^{a,e}
EET 27-1	7,15 ± 0,71 ^{a,b,e}
EET 31-1	8,40 ± 0,53 ^{a,e}
EET ZF-18	0,00 ± 0,00

- *Los resultados se expresan como el promedio de un triplicado ± su desviación estándar.
- Misma letra (a, b, c, d) en cada columna representa valores que no son estadísticamente significativos ($p > 0,05$) por el test de comparaciones múltiples de Tukey.



- **Figura 30.** Contenido de Ácido gálico en los EET de murtila

En la figura 30 se pueden apreciar las diferencias entre el contenido de ácido gálico de los genotipos de murtila. El EET del genotipo ZF-18 fue el único en el que no se pudo detectar la presencia del ácido gálico. Los EETs de los genotipos 19-1 y 19-2 fueron los que obtuvieron las mayores concentraciones de ácido gálico ($15,44 \pm 2,61$ mg/g ES y $13,99 \pm 3,35$ mg/g ES respectivamente). Sus concentraciones no fueron significativamente diferentes ($p > 0,05$). El EET del genotipo 14-4 fue el que obtuvo la menor concentración de ácido gálico entre los 9 EETs en los que fue posible identificar este compuesto, con $4,08 \pm 0,21$ mg/g ES. Estos resultados son una contribución al conocimiento de los compuestos polifenólicos presentes en las hojas de murtila, debido a que no se había descrito la presencia de ácido gálico en estudios previos en dichas hojas y tampoco se había realizado una comparación de su contenido en distintos genotipos. Los cromatogramas obtenidos para la cuantificación de ácido gálico en los EETs de murtila se muestran en el Anexo 3.a.

A continuación, en la Tabla 12, se muestra el resumen del contenido de los compuestos fenólicos identificados en los genotipos de murtila.

Tabla 12. Resumen del contenido de compuestos fenólicos presentes en los EETs de murtila

Genotipo	mg quercetina/g ES ± DS*	mg rutina/g ES ± DS*	mg ácido gálico/g ES ± DS*
EET 8-2	8,98 ± 0,47^a	2,30 ± 0,53^a	10,72 ± 0,45^{a,d}
EET 14-4	4,21 ± 0,11^b	3,84 ± 0,21^{a,b}	4,08 ± 0,21^{b,e}
EET 19-1	1,50 ± 0,09^{c,e}	7,27 ± 1,57^c	15,44 ± 2,61^c
EET 19-1_{ha}	0,89 ± 0,07^{c,d,f}	0,00 ± 0,00	7,88 ± 1,16^{a,b,e}
EET 19-2	0,66 ± 0,15^{d,f}	7,32 ± 1,58^c	13,99 ± 3,35^{c,d}
EET 22-1	1,73 ± 0,04^e	5,51 ± 0,29^{b,c}	4,71 ± 0,31^e
EET 23-2	1,18 ± 0,04^{c,d,e}	4,63 ± 0,02^{a,b}	8,68 ± 0,11^{a,e}
EET 27-1	0,80 ± 0,47^{d,f}	0,00 ± 0,00	7,15 ± 0,71^{a,b,e}
EET 31-1	0,87 ± 0,08^{c,d,f}	0,00 ± 0,00	8,40 ± 0,53^{a,e}
EET ZF-18	0,25 ± 0,09^f	12,73 ± 0,14^d	0,00 ± 0,00

- *Los resultados se expresan como el promedio de un triplicado ± su desviación estándar.
- Misma letra (a, b, c, d) en cada columna representa valores que no son estadísticamente significativos ($p > 0,05$) por el test de comparaciones múltiples de Tukey (Anexo 3c).

En la Tabla 12 podemos apreciar de mejor manera las diferencias que existen en la composición de los compuestos fenólicos estudiados entre los diferentes EETs de los 10 genotipos de murtila. Debido a que dichos genotipos fueron cultivados, y las muestras fueron recolectadas, en las mismas condiciones, podemos atribuir estas diferencias en la composición de los EETs a las diferencias en sus genotipos.

No existe relación entre las concentraciones de quercetina, rutina y ácido gálico presentes en los EETs, lo que podemos apreciar a continuación en la Tabla 13, donde se exponen los coeficientes de Pearson obtenidos al realizar un estudio comparativo entre las concentraciones de dichos compuestos fenólicos.

Tabla 13. Coeficiente de Pearson obtenido para la correlación entre los compuestos fenólicos cuantificados en los EETs

Correlación entre	Coeficiente de Pearson
Quercetina vs rutina	$r = -0,2167$
Quercetina vs ácido gálico	$r = 0,1230$
Rutina vs ácido gálico	$r = -0,1909$

4.2.4.4 Correlación entre CE₅₀, EA y quercetina, rutina y ácido gálico

Quercetina, rutina y ácido gálico han demostrado tener actividad frente al radical DPPH (Villaño *et al*, 2007), por lo que podemos afirmar que estos compuestos aportan a la capacidad que tienen los EETs de neutralizar dicho radical.

Para determinar si existe una relación entre la concentración de cada compuesto fenólico estudiado con las CE₅₀ y EA obtenidas a partir de ensayo del DPPH• para cada EET, se utilizó el coeficiente de Pearson. Los datos obtenidos de estos análisis se muestran a continuación en la Tabla 14.

Tabla 14. Correlación entre CE₅₀, EA y quercetina, rutina y ácido gálico

	Quercetina	Rutina	Ácido gálico
CE ₅₀	$r = -0,1017$	$r = -0,4664$	$r = 0,6090$
EA	$r = 0,3915$	$r = 0,0575$	$r = 0,3466$

Como se puede observar en la Tabla 12, no existen relaciones perfectas entre las variables estudiadas. Se puede destacar la relación positiva existente entre la concentración de ácido gálico y la CE₅₀ de los EETs de murta estudiados ($r = 0,6090$). Esta relación positiva indicaría que al aumentar las concentraciones de ácido gálico, aumentan los valores de CE₅₀, y por lo tanto la capacidad

antioxidante del extracto disminuye. Como se señaló anteriormente, el ácido gálico ha demostrado ser activo frente al radical DPPH, y por lo tanto llama la atención que un aumento en su concentración disminuya la capacidad antioxidante de los extractos.

Esto podría deberse a que la capacidad antioxidante de los EETs no está definida por la presencia de un solo compuesto, sino por la totalidad de los compuestos fenólicos presentes en ellos y por lo tanto podría existir cierta competitividad entre los componentes de los EETs que impidiera el atrapamiento del radical DPPH, lo que se vería reflejado en una mayor CE_{50} .

También se han descrito interacciones de sinergismo y antagonismo entre los compuestos fenólicos presentes en una mezcla, lo que afectaría, finalmente, la actividad antioxidante de un extracto (Hidalgo *et al*, 2010). Esto también podría explicar que el aumento en la concentración de un compuesto antioxidante, como lo es el ácido gálico, provocara una disminución en la CE_{50} de los EETs a través de interacciones de antagonismo con otras moléculas antioxidantes presentes en dichos extractos.

5. Conclusiones

- Se confirma la hipótesis, ya que los 10 genotipos de murtila, cultivados en las mismas condiciones, presentaron variaciones en la capacidad y eficiencia antioxidante debido a variaciones en su composición fenólica.
- El EET del genotipo 14-4 fue el que resultó tener la más alta eficiencia antioxidante ($2,12 \times 10^{-3}$) respecto de los demás EETs estudiados. En el EET de este genotipo se pudo identificar la presencia de quercetina, rutina y ácido gálico.
- Los 10 genotipos de murtila presentaron quercetina en sus EETs.
- Todos los genotipos presentaron ácido gálico en sus extractos, excepto el genotipo ZF-18.
- Por primera vez se identificó la presencia de ácido gálico en extractos de hojas de murtila, siendo esto un aporte al conocimiento sobre la composición fenólica de dichas hojas.
- De los 10 genotipos de murtila estudiados, 7 presentaron rutina en sus EETs. Los genotipos 19-1_{ha}, 27-1 y 31-1 no presentaron este compuesto, el cual había sido identificado en estudios previos realizados en extractos de hojas de murta.
- Ninguno de los EETs presentó miricitrina, flavonoide que había sido identificado previamente en hojas de murtila.
- Las concentraciones de quercetina, rutina y ácido gálico no se correlacionan, por si solas, con la actividad antioxidante de los EETs de murtila. Esto se debe a que esta actividad no depende de un compuesto en específico, si no a la mezcla presente, donde interacciones de sinergismo y antagonismo pueden afectar la actividad de los extractos.

- Por primera vez se cuantificó flavanonas en hojas de murtila, lo que constituye un aporte al conocimiento de la composición fenólica de dichas hojas.

6. Referencias Bibliográficas

- AGATI G., AZZARELLO E., POLLASTRI S., TATTINI M. Flavonoids as antioxidants in plants: location and functional significance. *Plant Sci.* 2012;196:67-76.
- AGUIRRE M.C., DELPORTE C., BACKHOUSE N., ERAZO, S., LETELIER, M.E., CASSELS, B.K., SILVA, X., ALEGRÍA, S., NEGRETE, R. Topical anti-inflammatory activity of 2alpha-hydroxy pentacyclic triterpene acids from the leaves of *Ugni molinae*. *Bioorg. Med. Chem.* 2006;14(16):5673-5677.
- AVELLO M, SUWALSKY M. Radicales libres, antioxidantes naturales y mecanismos de protección. *Atenea* 2006;(494):161-172.
- CHANG C., YANG M., WEN H., CHERN J. Estimation of Total Flavonoid Content in Propolis by Two Complementary Colorimetric Methods. *J. Food Drug Anal.* 2002;10(3):178-182.
- CICCIO N., LANORTE M.T., PARAGGIO M., VIGGIANO M., LATTANZIO, V.. A reproducible, rapid and inexpensive Folin–Ciocalteu micro-method in determining phenolics of plant methanol extracts. *Microchem. J.* 2009;91(1):107-110.
- DELPORTE C., BACKHOUSE N., INOSTROZA V., AGUIRRE, M.C., PEREDO, N., SILVA, X., NEGRETE, R., MIRANDA, H.F. Analgesic activity of *Ugni molinae* (murtilla) in mice models of acute pain. *J. Ethnopharmacol.* 2007;112(1):162-165.
- FLORIANI G., GASPARETTO J.C., PONTAROLO R., GONÇALVES A.G. Development and validation of an HPLC-DAD method for simultaneous determination of cocaine, benzoic acid, benzoylecgonine and the main adulterants found in products based on cocaine. *Forensic Sci. Int.* 2014;235:32-9.

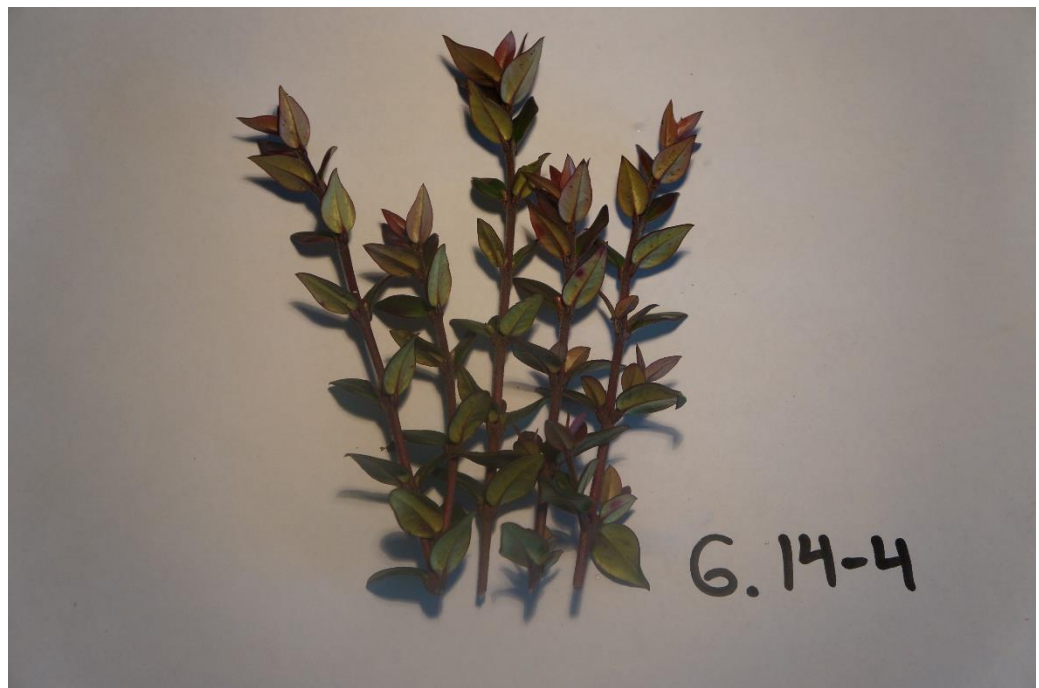
- HEIM K.E., TAGLIAFERRO A.R., BOBILYA D.J. Flavonoid antioxidants: chemistry, metabolism and structure-activity relationships. *J. Nutr. Biochem.* 2002;13(10):572-584.
- HIDALGO M., SÁNCHEZ-MORENO C., DE PASCUAL-TERESA S. Flavonoid–flavonoid interaction and its effect on their antioxidant activity. *Food Chem.* 2010;121(3):691-696.
- KEDARE S.B., SINGH R.P. Genesis and development of DPPH method of antioxidant assay. *J. Food Sci. Technol.* 2011;48(4):412-22.
- KHAN M.K., ZILL-E-HUMA, DANGLES O. A comprehensive review on flavanones, the major citrus polyphenols. *J. Food Compos. Anal.* 2014;33(1):85-104.
- MICHODJEHOUN-MESTRES L., SOUQUET J-M., FULCRAND H., BOUCHUT C., REYNES M., BRILLOUET J-M. Monomeric phenols of cashew apple (*Anacardium occidentale* L.). *Food Chem.* 2009;112(4):851-857.
- PASTENES C., SANTA-MARÍA E., INFANTE R., FRANCK N. Domestication of the Chilean guava (*Ugni molinae* Turcz.), a forest understorey shrub, must consider light intensity. *Sci. Hortic. (Amsterdam)*. 2003;98(1):71-84.
- POPOVA M., BANKOVA V., BUTOVSKA D., PETKOV, V., NIKOLOVA-DAMYANOVA, B., SABATINI, A.G., MARCAZZAN, G.L., BOGDANOV, S. Validated Methods for the Quantification of Biologically Active Constituents of Poplar-type Propolis. *Phytochem. Anal.* 2004;15:235-240.
- PRIOR R.L., WU X., SCHAICH K. Standardized Methods for the Determination of Antioxidant Capacity and Phenolics in Foods and Dietary Supplements. *J. Agric. Food Chem.* 2005;53(10):4290-4302.

- RUBILAR M., JARA C., POO Y., ACEVEDO, F., GUITIERREZ, C., SINEIRO, J., SHENE, C. Extracts of Maqui (*Aristotelia chilensis*) and Murta (*Ugni molinae* Turcz): Sources of Antioxidant Compounds and α -Glucosidase / α -Amylase Inhibitors. *J. Agric. Food Chem.* 2011;59:1630-1637.
- RUBILAR M., PINELO M., IHL M., SCHEUERMANN E., SINEIRO J., NUÑEZ M.J. Murta Leaves (*Ugni molinae* Turcz) as a Source of Antioxidant Polyphenols. *J. Agric. Food Chem.* 2006;54(1):59-64.
- SÁNCHEZ-MORENO C., LARRAURI A., SAURA-CALIXTO F. A Procedure to Measure the Antiradical Efficiency of Polyphenols. *J sci Food Agric* 1998;76:270-276.
- SEGUER, I., PEÑALOZA E., GAETE, N.C., MONTENEGRO, A. TORRES, A. Colecta y caracterización molecular de germoplasma de murta (*Ugni molinae* Turcz.) en Chile. *Agro sur.* 2000; 28(4).
- SHENE C., CANQUIL N., JORQUERA M., PINELO, M., RUBILAR, M., ACEVEDO, F. VERGARA, C., VON BAER, D., MARDONES, C. In vitro activity on human gut bacteria of murta leaf extracts (*Ugni molinae turcz.*), a native plant from Southern Chile. *J. Food Sci.* 2012;77(6).
- TABART J., KEVERS C., PINCEMAIL J. DEFRAIGNE J., DOMMES J. Comparative antioxidant capacities of phenolic compounds measured by various tests. *Food Chem.* 2009;113(4):1226-1233.
- TABOADA E., FISHER P., JARA R., ZUÑIGA, E., GIDEKEL, M., CABRERA, J.C., PEREIRA, E., GUTIERREZ-MORAGA, A., VILLALONGA, R., CABRERA, G. Isolation and characterisation of pectic substances from murta (*Ugni molinae* Turcz) fruits. *Food Chem.* 2010;123(3):669-678.

- VERRI JR., W.A., VICENTINI, F., BACARAT, M., GEORGETTI, S., CARDOSO, R., CUNHA, T., FERREIRA, S., CUNHA, F., FONSECA, M., CASAGRANDE, R. 2012. Flavonoids as anti-inflammatory and analgesic drugs: mechanisms of action and perspectives in the development of pharmaceutical forms. EN: Studies in Natural Products Chemistry. Atta-ur-Rahman. Volumen 36. ELSEVIER. Pp 297-330.
- VILLAÑO D., FERNÁNDEZ-PACHÓN M.S., MOYÁ M.L., Troncoso A.M., García-Parrilla M.C. Radical scavenging ability of polyphenolic compounds towards DPPH free radical. *Talanta* 2007;71(1):230-5.

ANEXOS

Anexos 1: Testigos Herbarios de los 10 genotipos de murtila





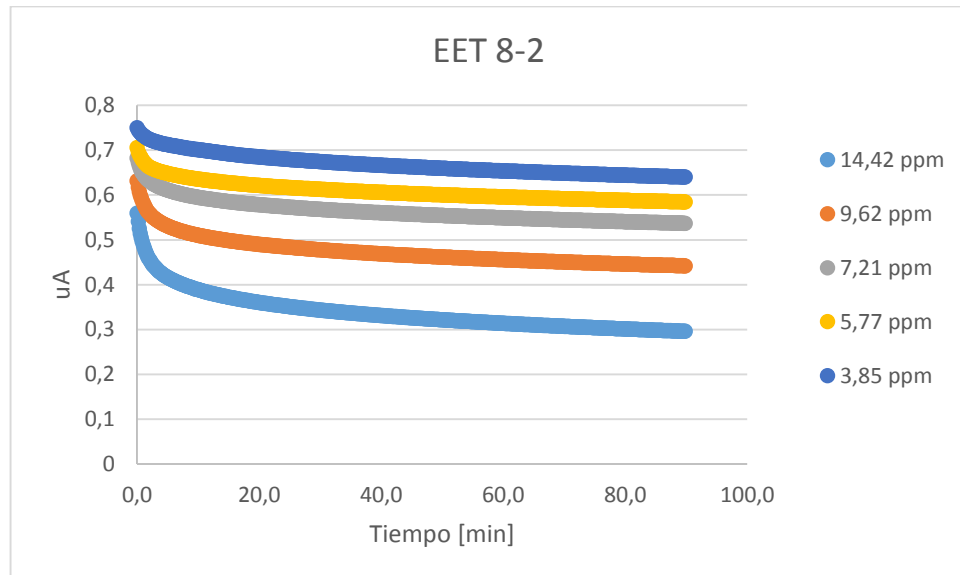
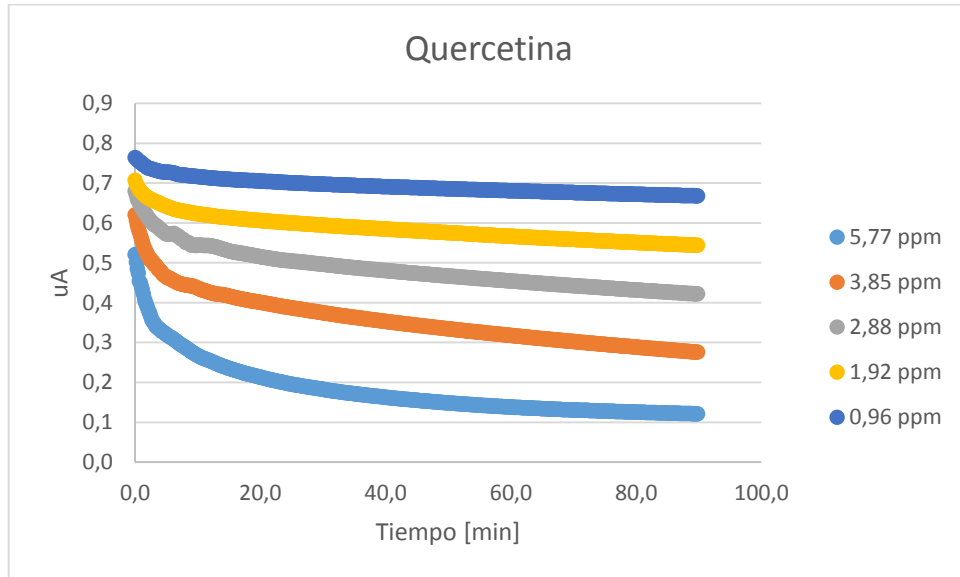


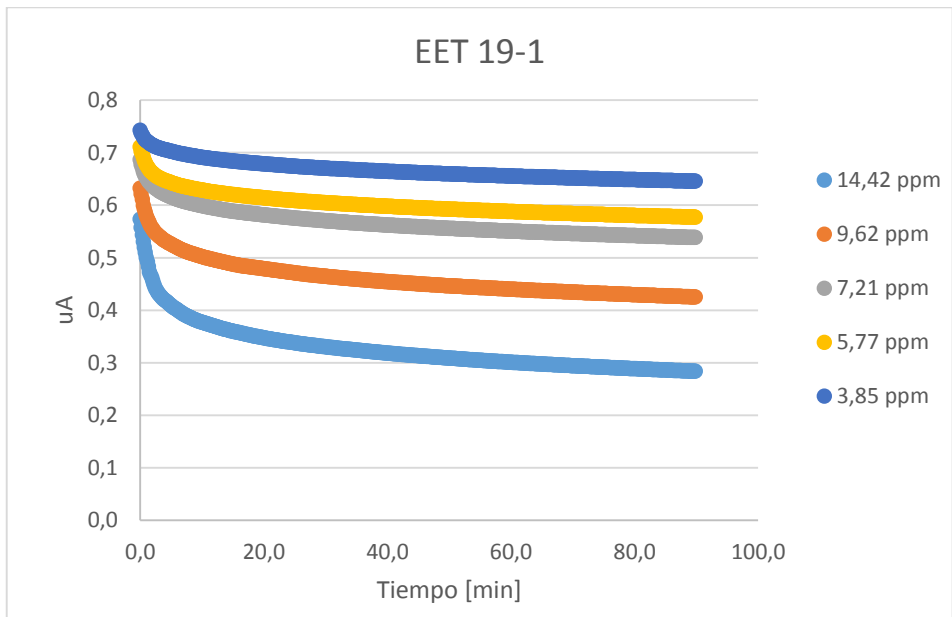
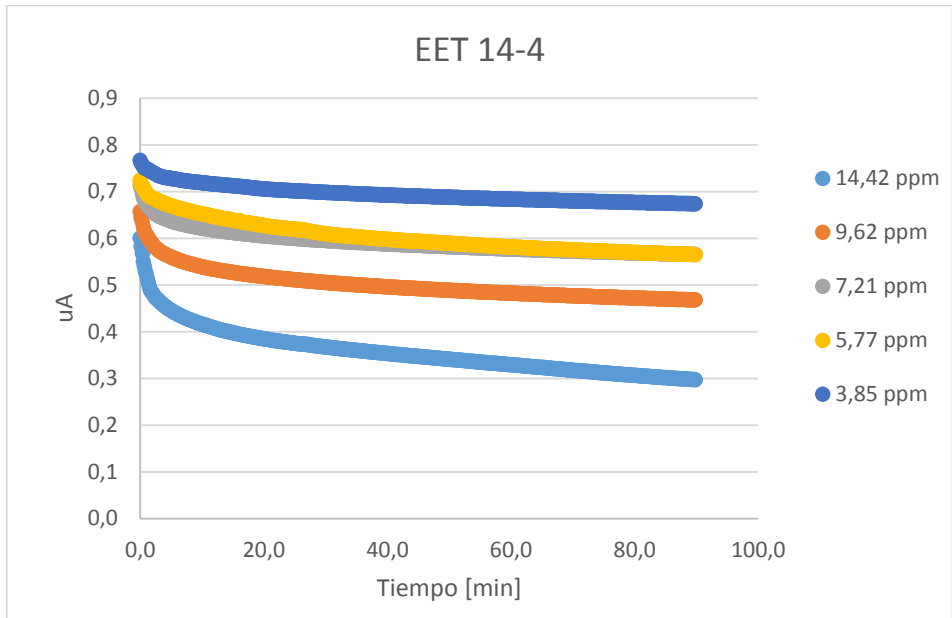


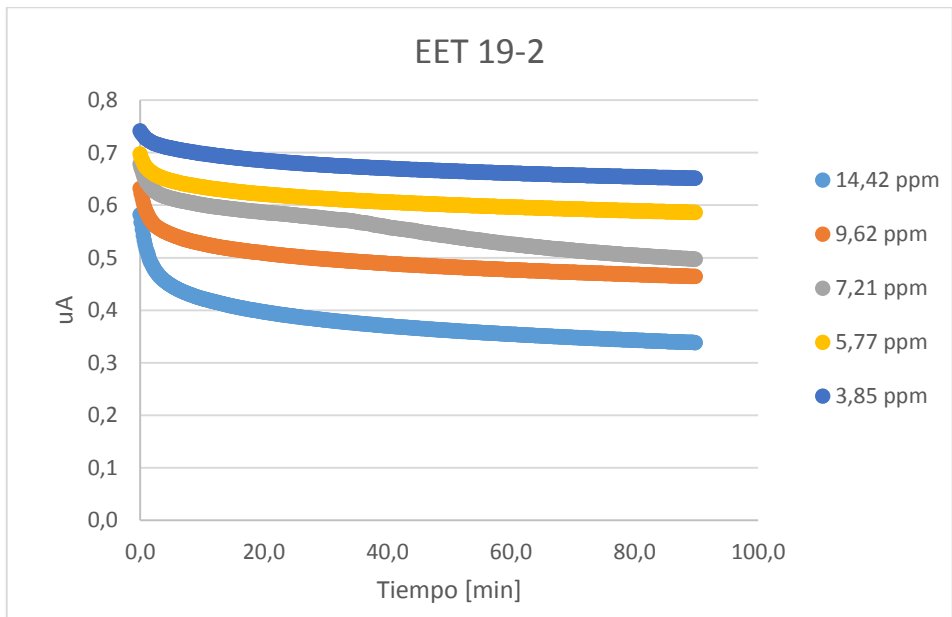
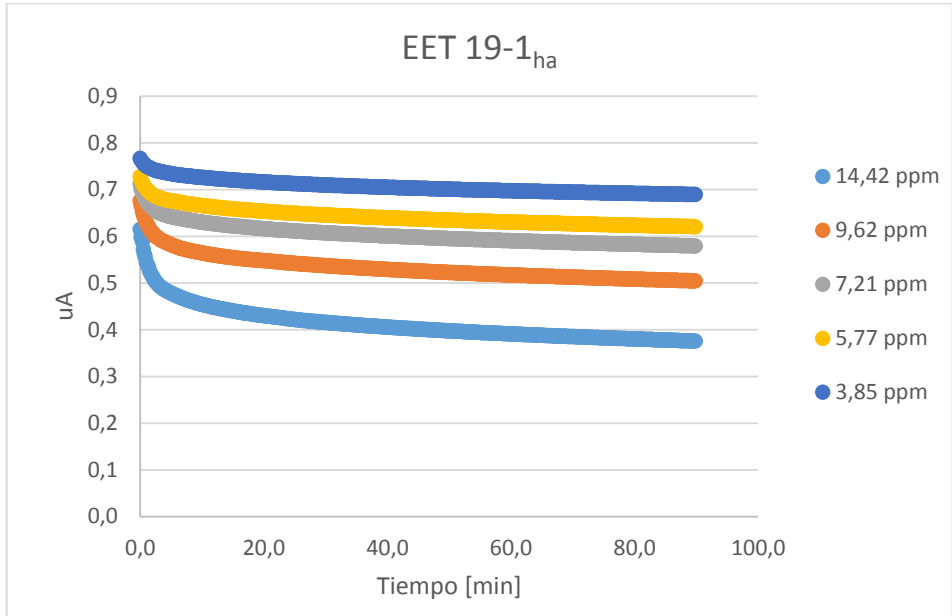


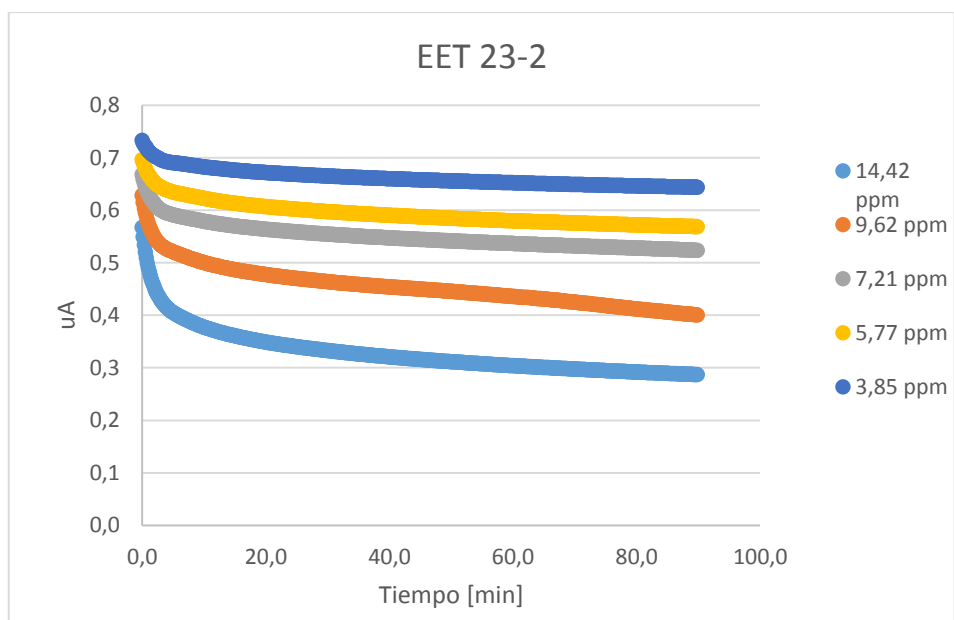
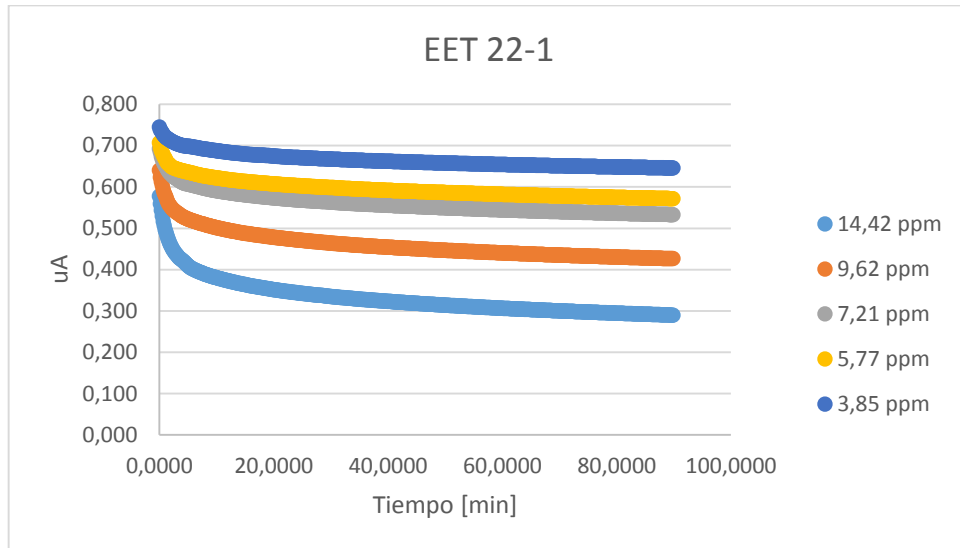
Anexo 2: Gráficos del ensayo del DPPH•

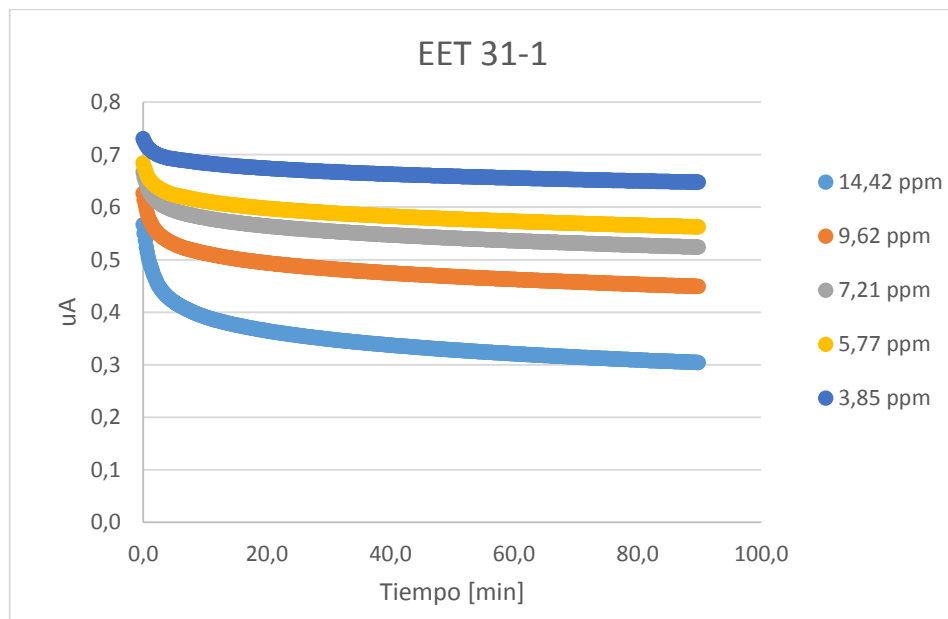
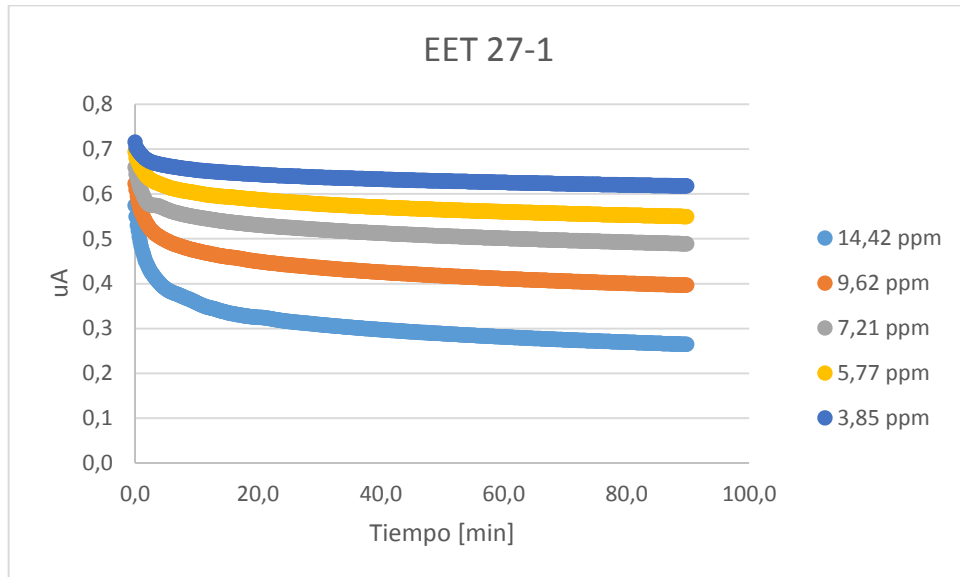
Anexo 2.a: Gráficos de la cinética de atrapamiento del radical DPPH

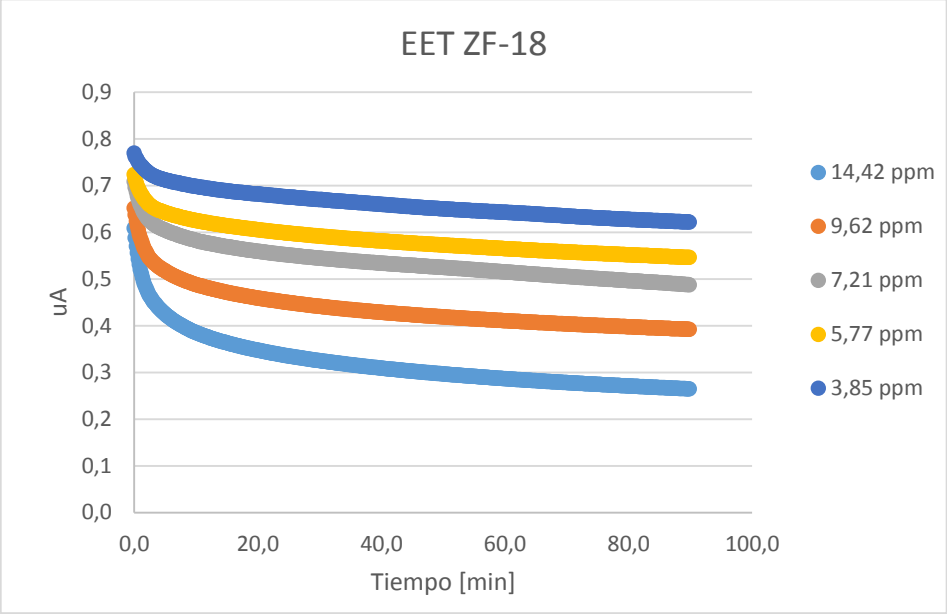




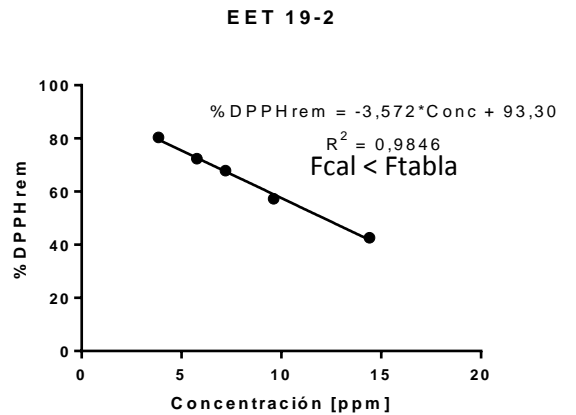
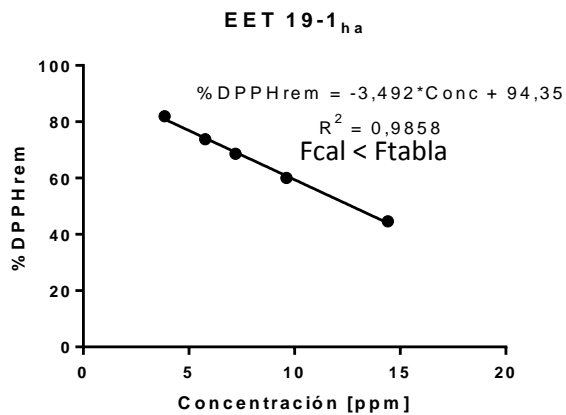
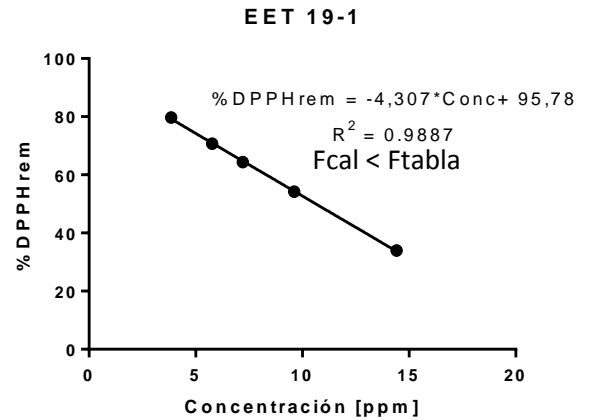
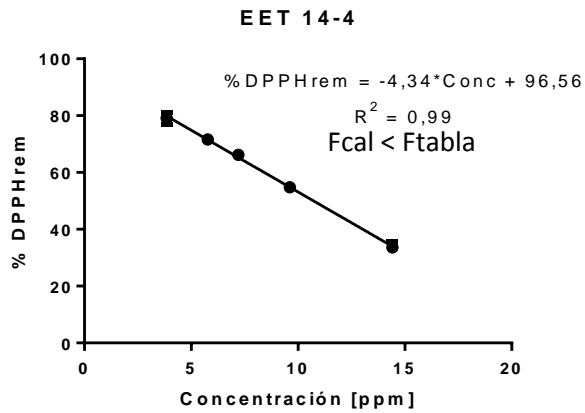
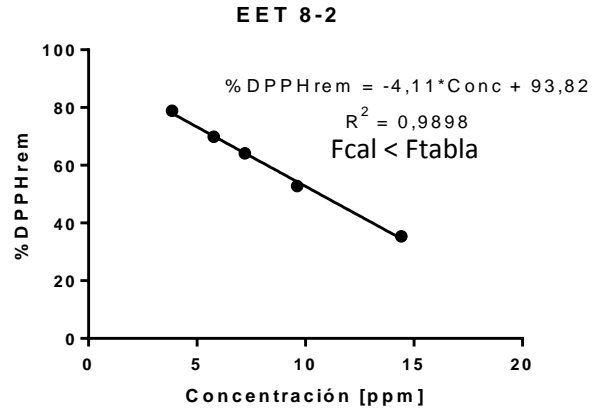
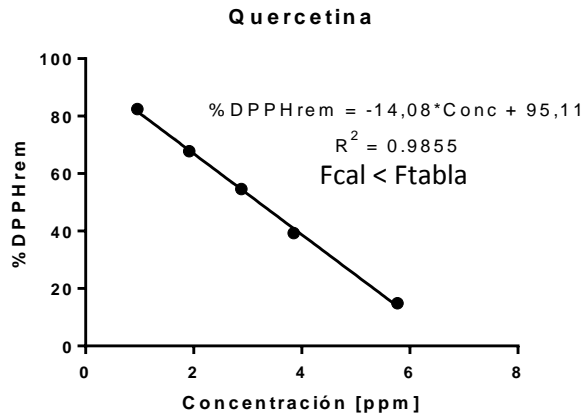




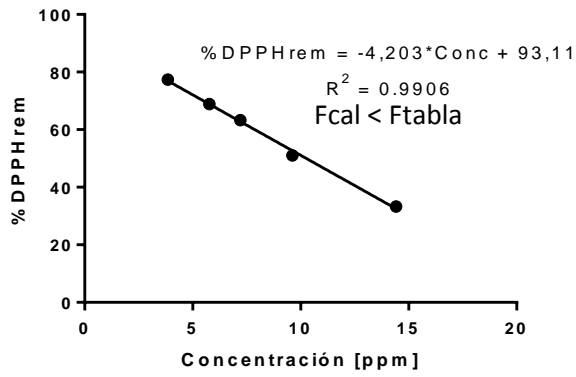




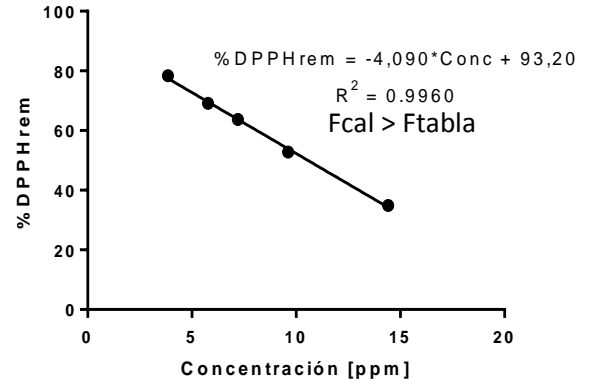
Anexo 2.b: %DPPHrem vs Conc de los EETs y de quercetina



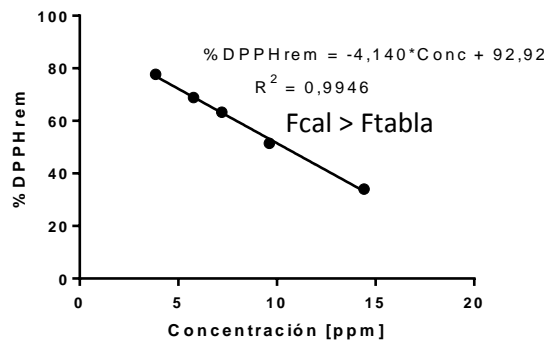
EET 22-1



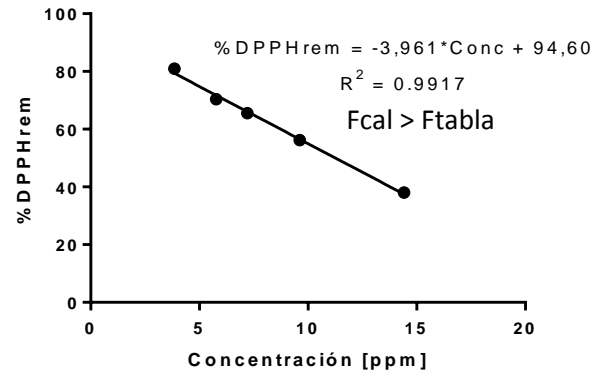
EET 23-2



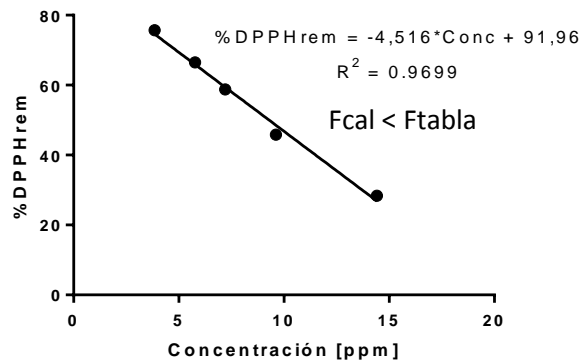
EET 27-1



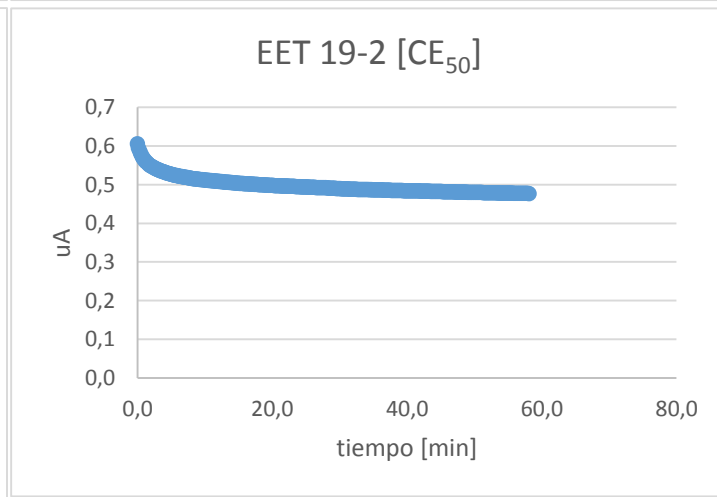
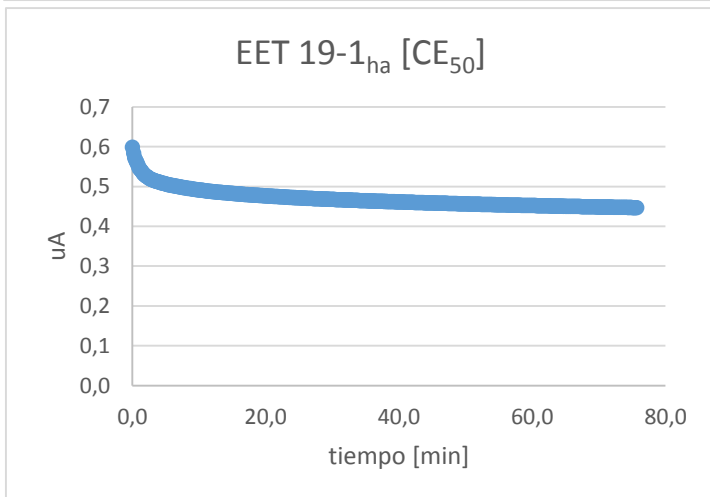
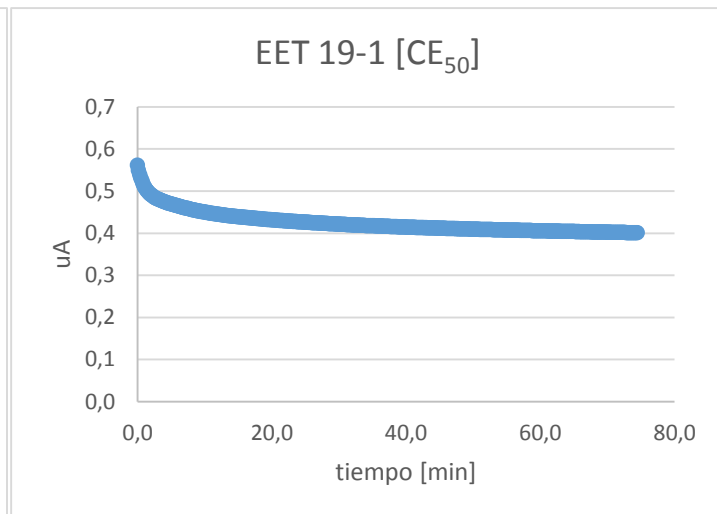
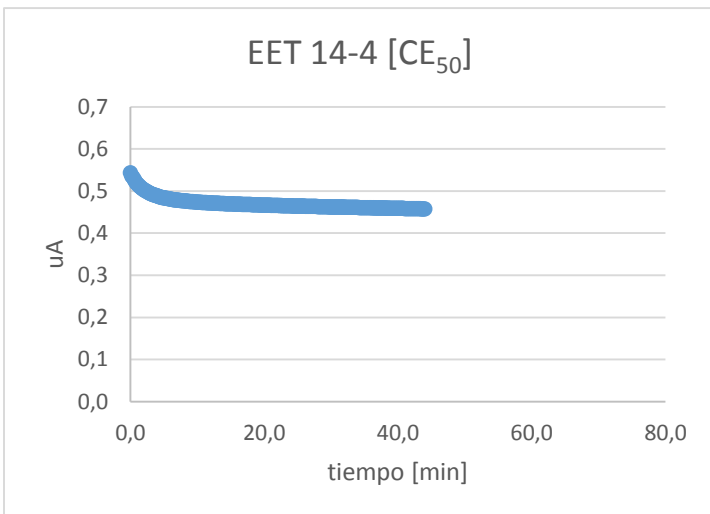
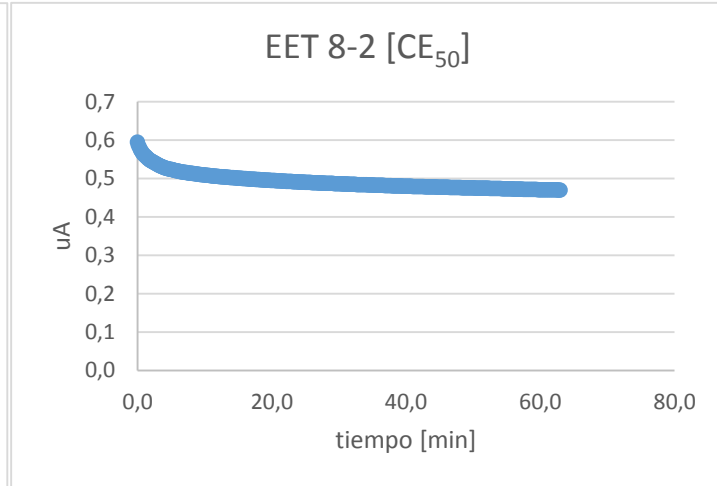
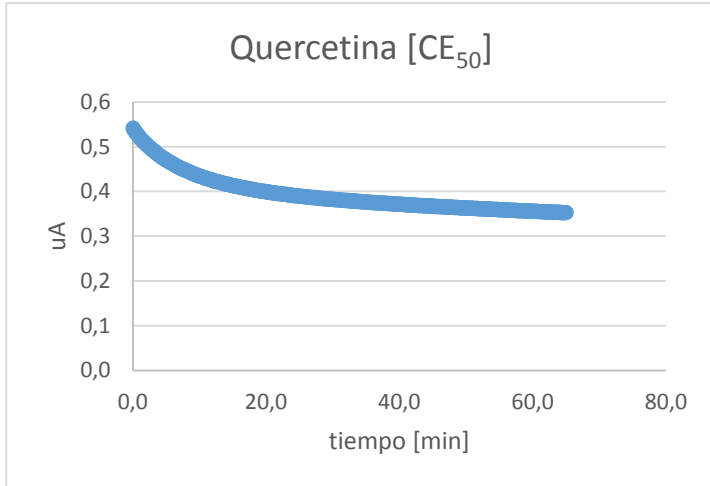
EET 31-1

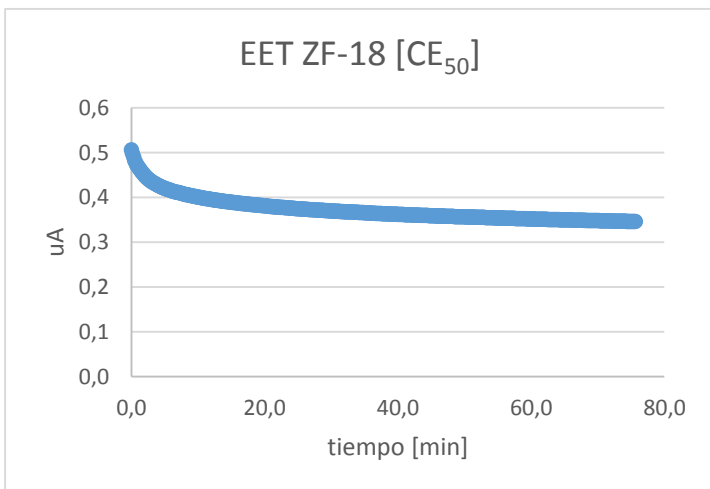
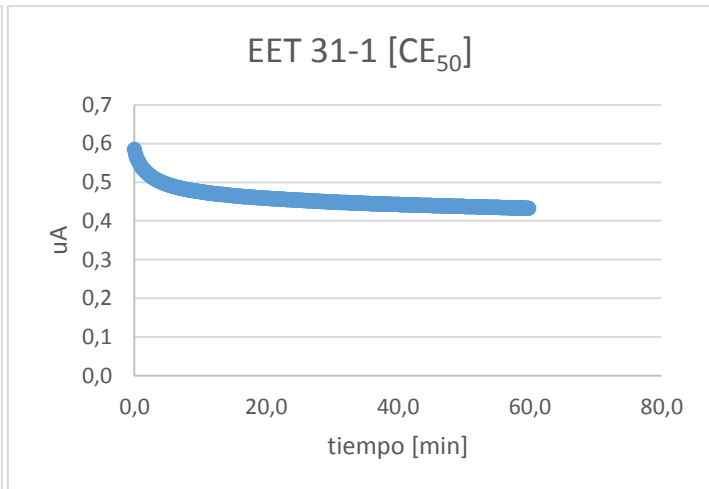
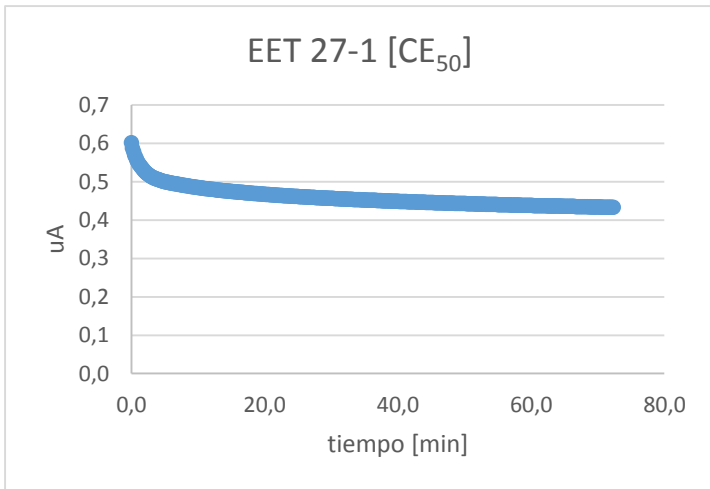
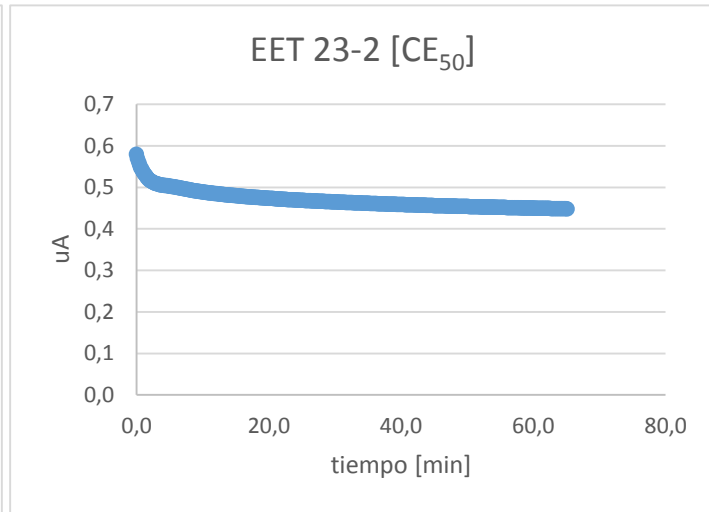
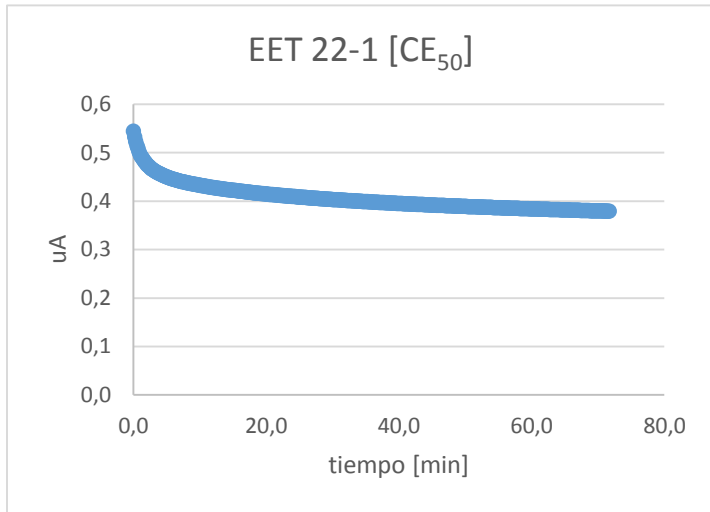


EET ZF-18

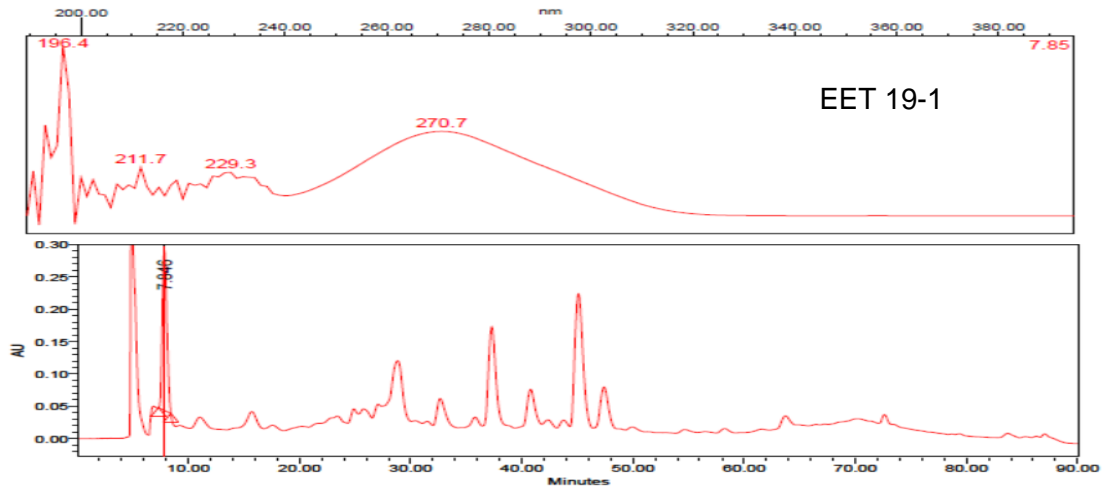
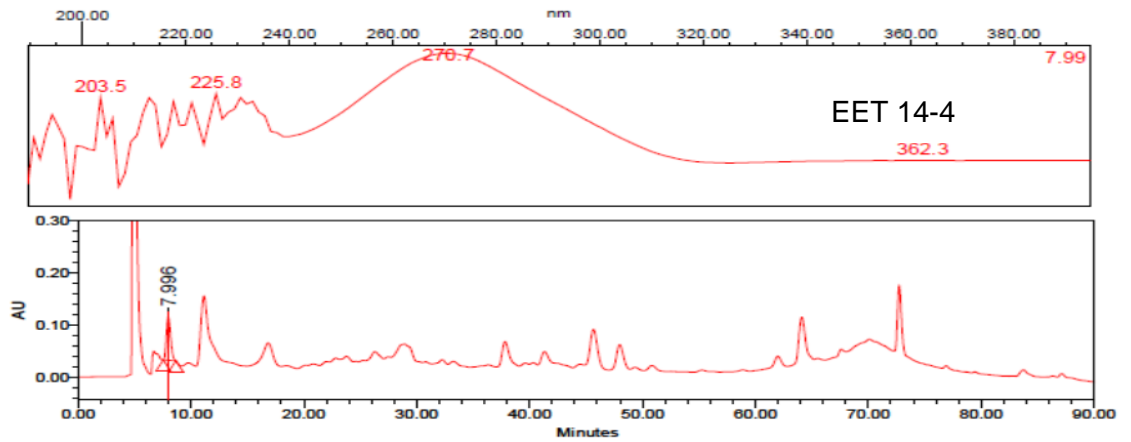
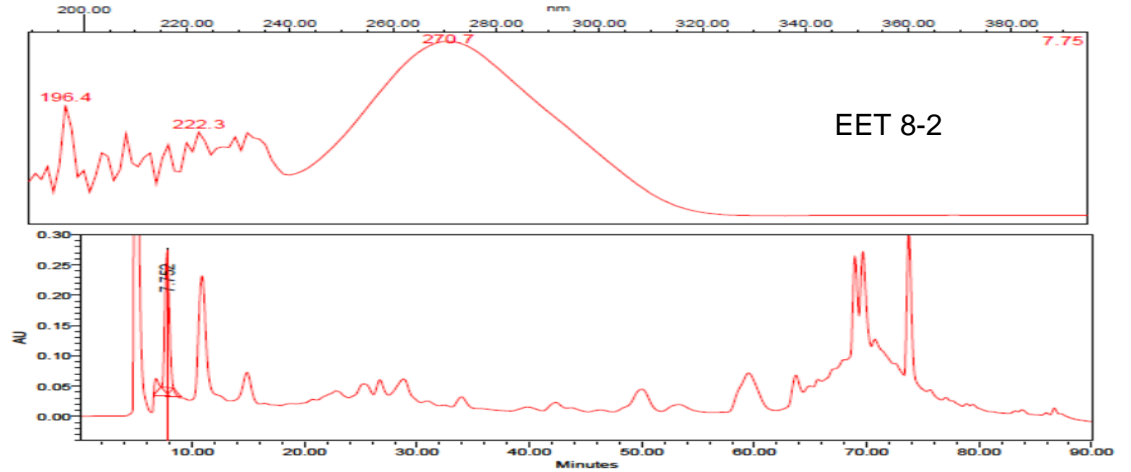


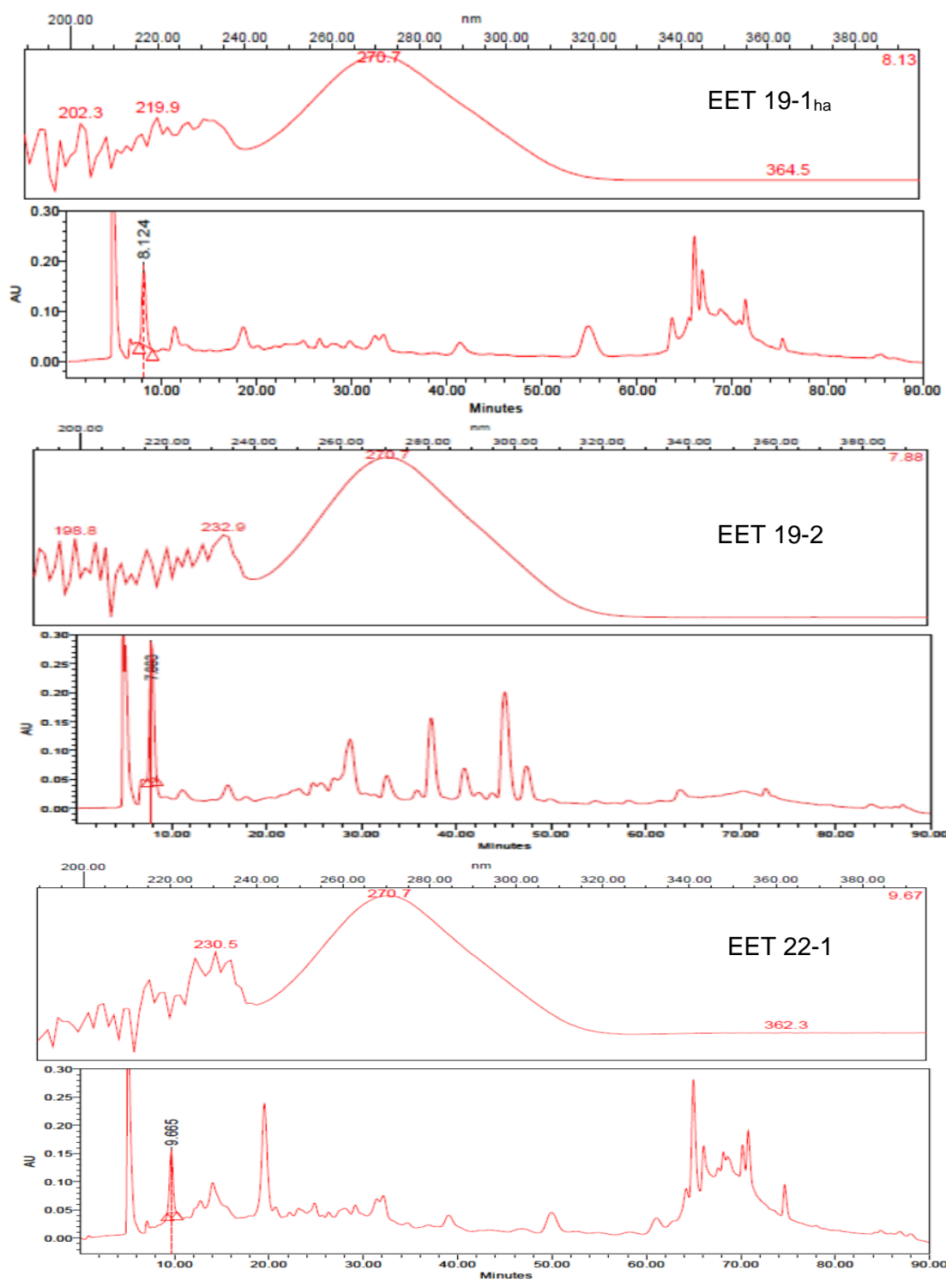
Anexo 2.c: Gráficos de TEC₅₀

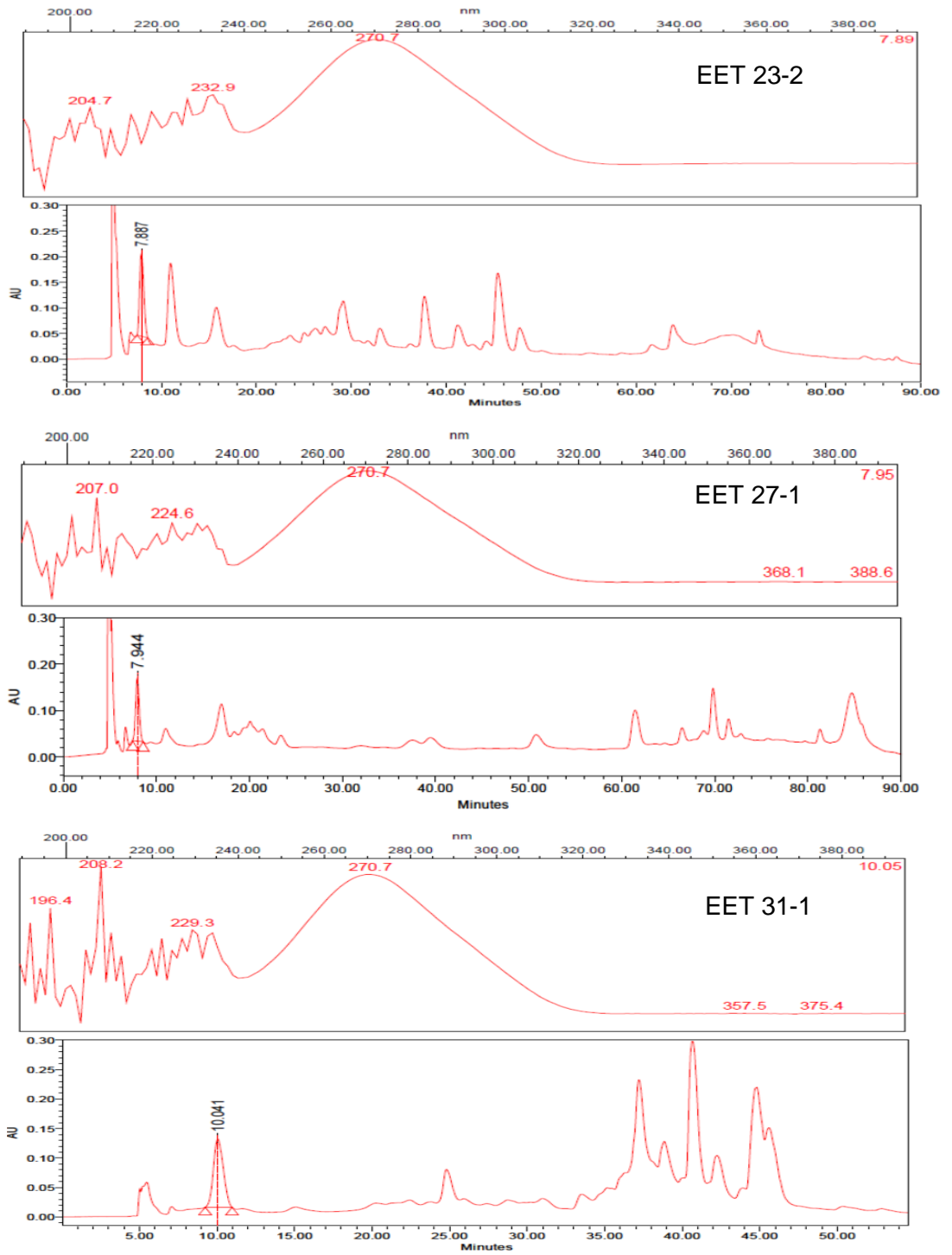




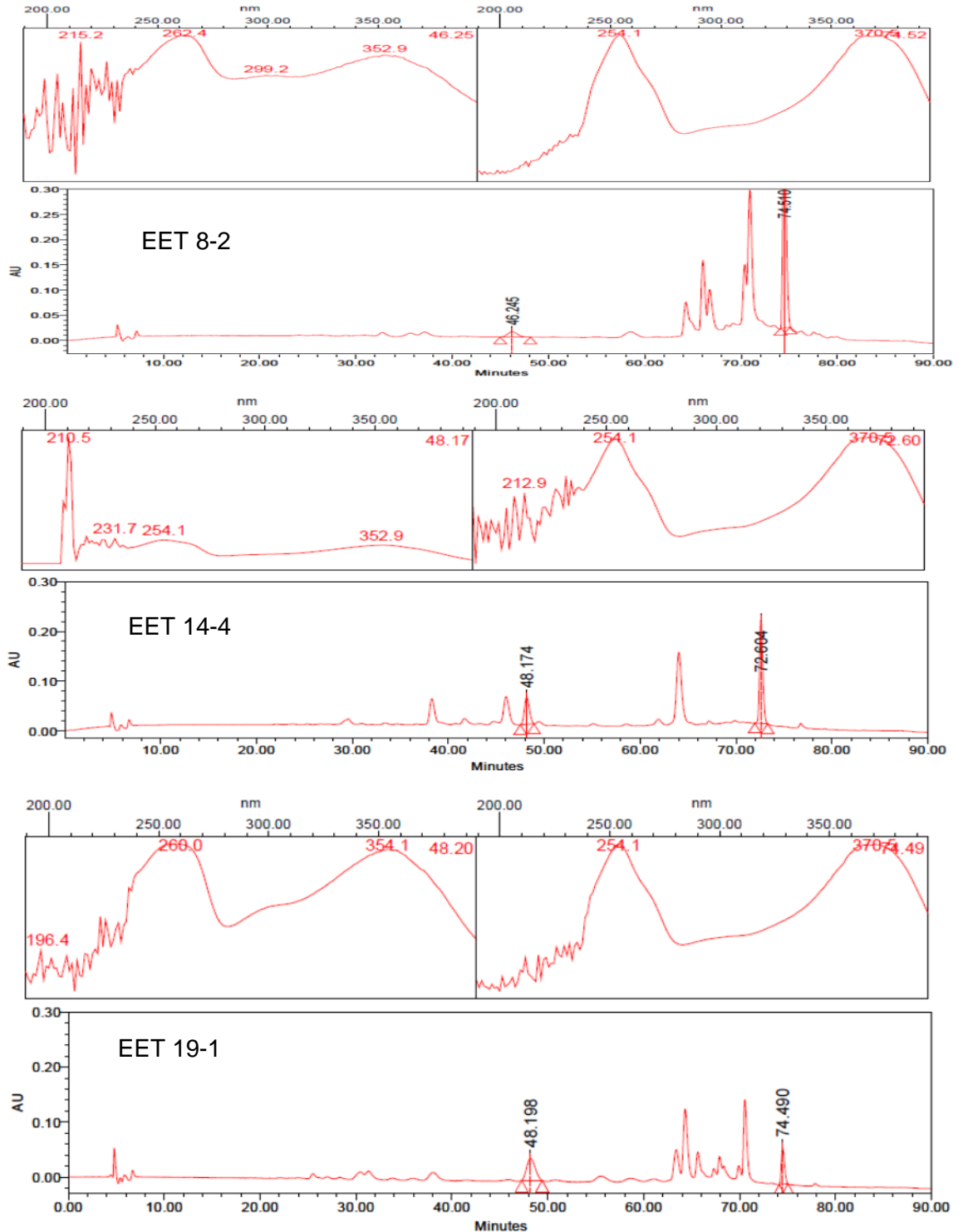
Anexo 3: Cromatogramas obtenidos por CLAE-DAD
Anexo 3.a: Cromatogramas a 270 nm para identificación y
cuantificación de ácido gálico

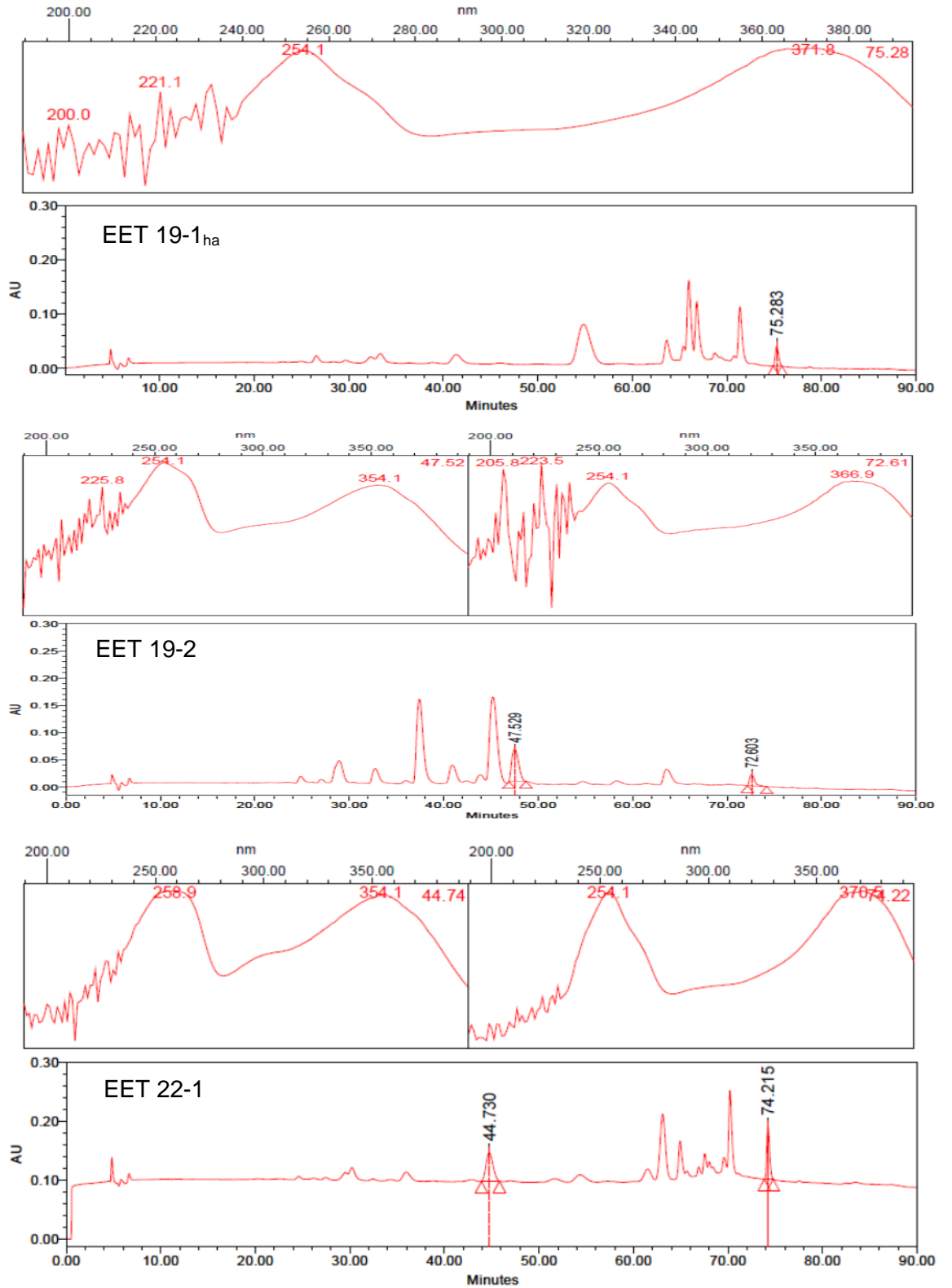


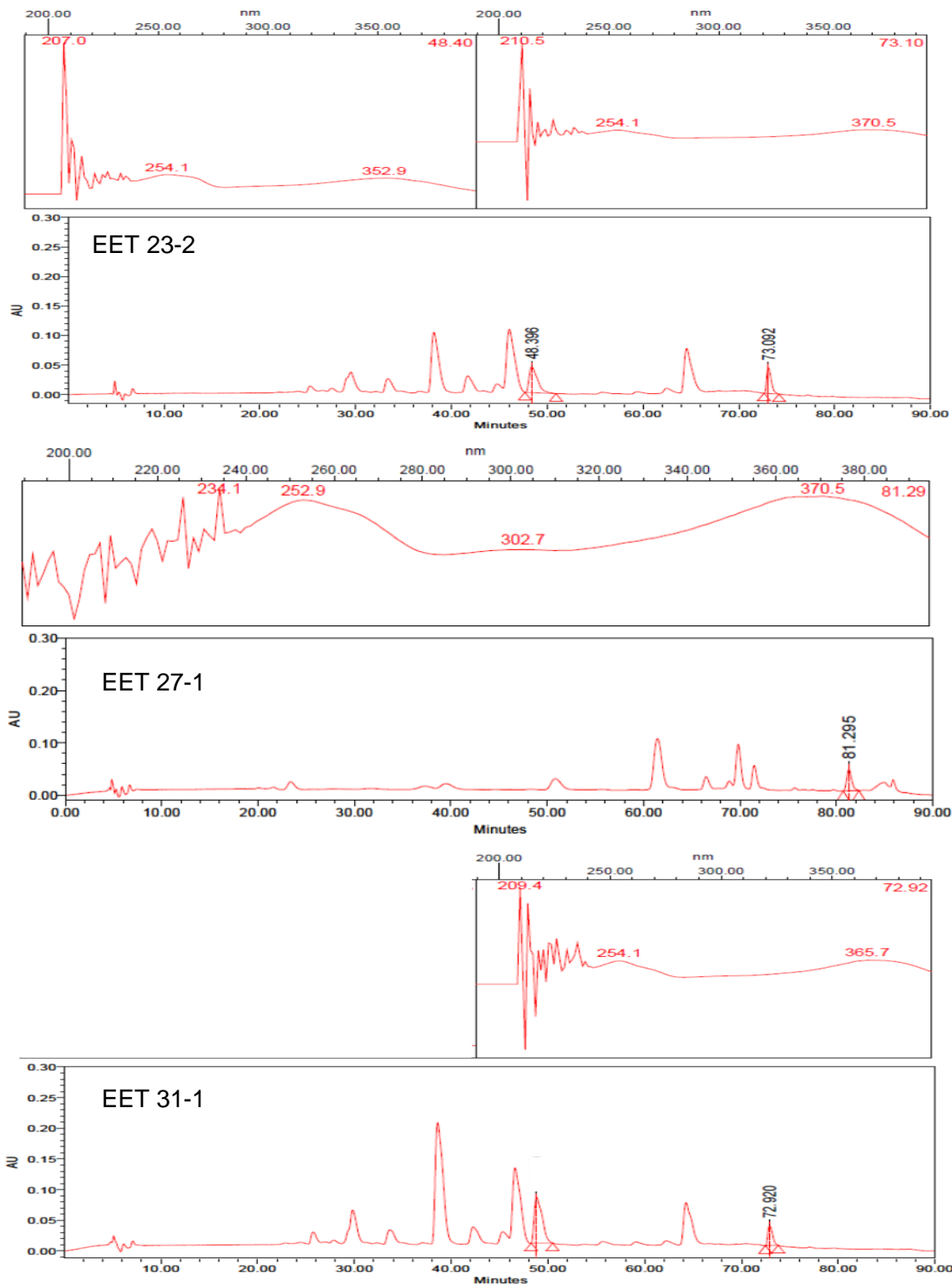


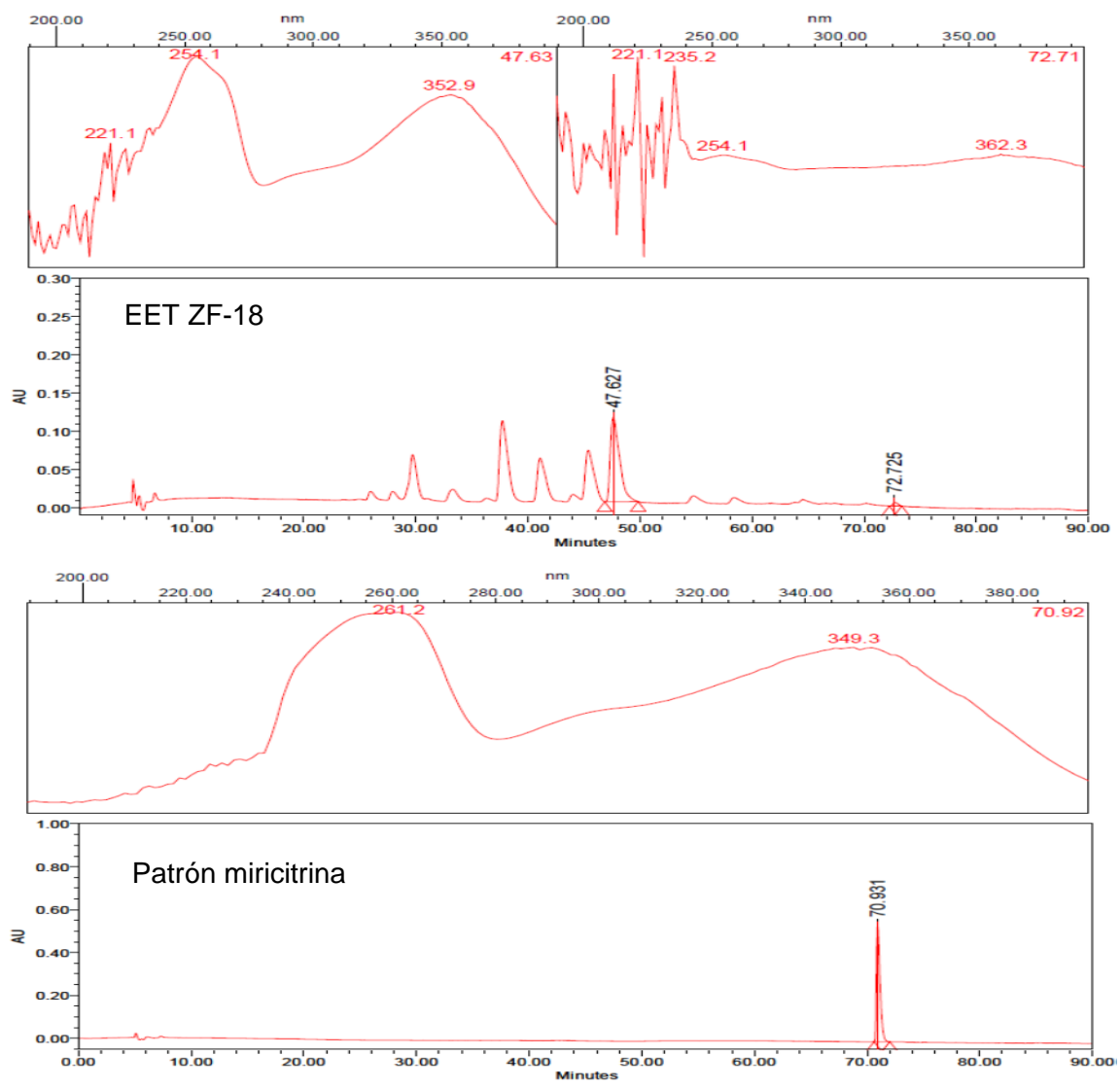


Anexo 3.b: Cromatogramas a 360nm para identificación y cuantificación de quercetina, rutina y miricitrina









Anexo 4: Resúmenes de congresos asistidos

Anexo 4.a: A COMPARATIVE STUDY OF THE DPPH● RADICAL SCAVENGING KINETICS OF DIFFERENT *UGNI MOLINAE* GENOTYPES

Pérez-Arancibia R.¹, Peña-Cerda M.¹ Rivera-Gonzalez, D.¹, Valenzuela-Bustamante P.¹ Seguel I.², Delporte C.¹

¹Laboratorio de productos naturales, Departamento de Farmacología y Toxicología, Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas, Universidad de Chile. Santos Dumont 964, Santiago, Chile, postcode 8380492. ²INIA, Carillanca, IX Región.

Murtilla (*Ugni molinae*, Turcz.), also known as “murta”, is a wild shrub that grows in south-central Chile that is commonly used in Chilean folk medicine for the treatment of diarrhea, dysentery and to lessen urinary tract pain [1,2]. Several studies have been performed to assess the chemical composition of murta leaves [1,2,3]. The aim of this study is to compare the radical scavenge ability of 5 different ethanolic leaves extracts (EEs) from different genotypes of murtilla cultivated in the same conditions and selected by the quality of their fruits. The 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl radical (DPPH●) method studies the ability of the EEs to scavenge free radicals, and is based on the decrease of absorbance of the DPPH solution at 517nm when adding an antioxidant [6]. We found that there were no significant differences ($p < 0,05$) between the antioxidant capacities of the different EEs, except for the EE 19-1 ha, which had the highest concentration needed to reduce 50% of DPPH● (EC_{50}) (12.45 ± 0.5 mg/mL). EE 27-1 had the lowest EC_{50} (10.13 ± 0.58 mg/mL), thus being the extract with the highest antioxidant capacity. Previous studies have described the presence of phenolic substances, such as quercetin, myricetin, kaempferol epicatechin, and some of their glycosylated derivatives, which are supposed to be responsible for the antioxidant capacity of EEs [1,2,5,6]. The variations between the antioxidant capacities of the EEs can be related to differences on their phenolic composition due to their different genotypes.

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

References: 1. Avello M. et al. (2013) Brazilian Journal of Pharmacognosy 23(1): 44-50. 2. Rubilar M. et al. (2006) J. Agric. Food Chem., Vol. 54(1):59-64. 3. Aguirre M. et al. (2006) Bioorg. Med. Chem. 14: 5673–5677. 4. Villaño D. et al. (2007) Talanta 71(1):230–235. 5. Suwalsky M. et al. Food and Chemical Toxicology 44:1393–1398. 6. Hauser C. et al. (2014) Food packaging and shelf life 1(1): 77–85.

Anexo 4.b: Capacidad para neutralizar el radical DPPH de cinco extractos de genotipos de murtila. **(DPPH scavenging capacity of five extracts of murtila genotypes.)**

Rodrigo Pérez-Arancibia¹, Marcelo Peña-Cerda¹, Paula Valenzuela Bustamante¹, Ivette Seguel², Carla Delporte¹.

¹Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas, Universidad de Chile, Santiago, Chile.

²INIA, Carillanca, IX Región, Chile.

E-mail: rpereza@ug.uchile.cl

La murtila es un arbusto silvestre que crece en la zona centro-sur de Chile y que es utilizado por la medicina folclórica como analgésica y antiinflamatoria¹. Un estudio previo de los extractos etanólicos de hojas de murtila, demostró la presencia de diversos glicósidos de flavonoides, entre los que se pueden destacar glicósidos de quercetina, miricetina y canferol². Los flavonoides son metabolitos secundarios polifenólicos ampliamente distribuidos en el reino vegetal, siendo parte integral de la dieta humana debido a su presencia en frutas, verduras, vinos, té y cacao^{3, 4, 5}. Estos compuestos tienen la capacidad de actuar como antioxidantes, debido a que pueden donar átomos de hidrógeno o electrones, neutralizando radicales libres. La mayoría de los efectos benéficos para la salud de los flavonoides le son atribuidos a su capacidad antioxidante, entre estos efectos benéficos se destacan sus efectos antibacteriales, antivirales, antiinflamatorios y cardioprotectores⁴. En este estudio se evaluaron las actividades antioxidantes de los extractos etanólicos (EET) de hojas de cinco genotipos de murtila. Dichos genotipos fueron cultivados bajo las mismas condiciones. Para evaluar la capacidad antioxidante se utilizó el método de neutralización del radical DPPH. Este método se basa en la decoloración del radical en la presencia de un compuesto antioxidante, lo que se puede medir espectrofotométricamente a través de la disminución de la absorbancia del DPPH• a 517 nm. La capacidad antioxidante de los extractos se representó a través del cálculo de la CE₅₀, concentración de antioxidante necesaria para disminuir la concentración de DPPH• en un 50%. La CE₅₀ es inversamente proporcional a la capacidad de neutralizar el radical DPPH. Los resultados muestran que no existieron diferencias significativas entre los EET, excepto para el EET-19-2, el cual fue el extracto con mayor CE₅₀, y por lo tanto menor capacidad antioxidante (12,3±0,6 µg/mL). El mejor antioxidante fue el EET-ZF-18 con una CE₅₀ = 9.6±0.5 µg/mL.

Referencias: 1. Delporte C, Backhouse N, Inostroza V, Aguirre MC, Peredo N, Silva X, Negrete R, Miranda HF. 2007. Analgesic activity of *Ugni molinae* (murtila) in mice models of acute pain. **Journal of Ethnopharmacology**. 112: 162-165. 2. Rubilar M, Pinelo M, Ihl M, Scheuermann E, Sineiro J, Nuñez MJ. 2006. Murta leaves (*Ugni molinae* Turcz) as a Source of Antioxidant Polyphenols. **J. Agric. Food Chem.** 54(1):59-64. 3. Di carlo G, Mascolo N, Izzo AA, Capasso F. 1999. Flavonoids: old and new aspects of a class of natural therapeutic drugs. **Life Sciences**. 65(4): 337-353. 4. Cook NC, Samman S. 1995. Flavonoids-Chemistry, metabolism, cardioprotective effects and dietary sources. **Nutritional Biochemistry**. 7: 66-76. 5. Heim KE, Tagliaferro AR, Bobilya DJ. 2002. Flavonoid antioxidants: chemistry, metabolism and structure-activity relationships. **Journal of Nutritional Biochemistry**. 13: 572-584.

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