



**UNIVERSIDAD DE CHILE**

Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas

Departamento de Química Farmacológica y Toxicológica

DETERMINACIÓN DEL CONTENIDO DE TANINOS Y EVALUACIÓN DE LA  
DISMINUCIÓN DEL INFILTRADO CELULAR DE DISTINTOS GENOTIPOS DE  
*UGNI MOLINAE TURCZ.*

Memoria para optar al título de Químico Farmacéutico

**ZITA CAMILA AVELLO CHAMORRO**

**PROFESOR PATROCINANTE**

DRA. CARLA DELPORTE V.

Dpto. de Química Farmacológica y  
Toxicológica

**DIRECTORAS DE TESIS**

DRA. CARLA DELPORTE V.

Dpto. de Química Farmacológica y  
Toxicológica

DRA. IVETTE SEGUEL B.

INIA. Carillanca, Temuco

**Santiago, Chile**

**2016**

*A mi familia*

## **AGRADECIMIENTOS**

Primero que todo agradecer a mis padres Mario Avello Sánchez y Zita Chamorro Valdés por el cariño y apoyo entregado hoy y a lo largo de mi vida. Por darme las fuerzas necesarias para no decaer y seguir adelante. A mis hermanas Natalia y Valentina por acompañarme y alentarme a mirar hacia adelante. A mis abuelos maternos por todos los momentos vividos en su hogar, aconsejarme y enseñarme lecciones de vida que me hicieron ser mejor persona. A mis abuelos paternos en especial a Mario que hoy me acompaña desde el cielo, jamás olvidaré tus risas y positivismo. Agradecer a todos mis familiares, en especial mis primos hermanos Cristián y Ariel; y mi tía Agustina por toda una vida compartida y cariño incondicional.

Agradecer profundamente al Laboratorio de Productos Naturales, en especial a la profesora Carla Delporte por darme la oportunidad, sin conocerme, de desarrollar mi memoria, darme herramientas, guiarme tanto en el ámbito docente como personal y por alentarme a creer en mis capacidades. A Paola, Alejandrina, Rubén y Daniela por la amistad y ayuda entregada. A Jorge, Cata, Don David, Paula, Gabriela, Rodrigo, Marcelo, Ítalo y José Luis por su apoyo durante todo el proceso.

Finalmente agradecer a Karina, Daniela, Claudia, Loreto y Glinys por su amistad y apoyo incondicional durante más de 15 años. A mis amigas de universidad Constanza Acevedo y Marilyn Fuentes por todos los momentos compartidos en estos años de estudio.

## **FINANCIAMIENTO**

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

## TABLA DE CONTENIDOS

|   |            |
|---|------------|
| <b>INDICE DE FIGURAS.....</b>   | <b>III</b> |
| <b>INDICE DE TABLAS .....</b>   | <b>IV</b>  |
| <b>INDICE DE ANEXOS.....</b>  | <b>VI</b>  |
| <b>ABREVIATURAS .....</b>   | <b>VII</b> |
| <b>RESUMEN.....</b>   | <b>IX</b>  |
| <b>ABSTRACT .....</b>   | <b>XI</b>  |
| <b>I. INTRODUCCION .....</b>  | <b>1</b>   |
| 1.1 <i>UGNI MOLINAE TURCZ.....</i>  | 1          |
| 1.2    METABOLITOS SECUNDARIOS DE LAS HOJAS DE <i>U. MOLINAE</i> Y SU ACTIVIDAD FARMACOLÓGICA.<br>2 | 2          |
| 1.2.1 <i>Triterpenoides pentacíclicos.....</i>  | 2          |
| 1.2.2 <i>Compuestos fenólicos.....</i>  | 3          |
| 1.2.3 <i>Taninos.....</i>   | 5          |
| 1.3    INFLAMACIÓN .....  | 7          |
| 1.4    VARIABILIDAD GENÉTICA DE <i>U. MOLINAE</i> .....   | 11         |
| <b>II. HIPÓTESIS.....</b>   | <b>12</b>  |
| <b>III. OBJETIVOS .....</b>   | <b>12</b>  |
| 3.1    OBJETIVO GENERAL .....   | 12         |
| 3.2    OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....  | 12         |
| <b>IV. MATERIALES Y MÉTODOS .....</b>   | <b>13</b>  |
| 4.1    REACTIVOS .....  | 13         |
| 4.2    RECOLECCIÓN Y OBTENCIÓN DEL MATERIAL VEGETAL .....   | 13         |
| 4.3    ESTUDIO QUÍMICO .....  | 15         |
| 4.3.1 <i>Obtención de los extractos a evaluar.....</i>  | 15         |
| 4.3.2 <i>Estudio cualitativo.....</i>   | 16         |
| 4.3.3 <i>Estudio cuantitativo: Determinación del contenido de taninos (CT).....</i>                 | 17         |
| 4.3.4 <i>Análisis estadístico.....</i>  | 22         |
| 4.4    ESTUDIO FARMACOLÓGICO .....  | 23         |
| 4.4.1 <i>Disminución del infiltrado celular inducido por TPA.....</i>                               | 23         |
| <b>V. RESULTADOS Y DISCUSIÓN .....</b>  | <b>31</b>  |
| 5.1    ESTUDIO QUÍMICO.....   | 31         |
| 5.1.1 <i>Rendimiento de los extractos de diez genotipos de U.molinae.....</i>                       | 31         |
| 5.1.2 <i>Estudio cualitativo: Reacciones de identificación.....</i>                                 | 32         |
| 5.1.3 <i>Estudio cuantitativo : Contenido de taninos.....</i>                                       | 33         |

|   |           |
|---|-----------|
| 5.2 ESTUDIO FARMACOLÓGICO .....   | 40        |
| 5.2.1 <i>Efecto de disminución del infiltrado celular inducido por TPA.</i> ..... | 40        |
| <b>VI. CONCLUSIONES .....</b>   | <b>50</b> |
| <b>VII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....</b>                                      | <b>51</b> |

## INDICE DE FIGURAS

|   |    |
|---|----|
| <b>Figura 1.</b> <i>Ugni molinae</i> Turcz. Familia Myrtaceae.....  | 1  |
| <b>Figura 2.</b> Compuestos fenólicos, que se encuentran solos o como derivados en las hojas de murtila. ....   | 4  |
| <b>Figura 3.</b> Esquema del proceso inflamatorio. ....   | 10 |
| <b>Figura 4.</b> Esquema de extracción de las hojas de <i>U. molinae</i> . ....   | 15 |
| <b>Figura 5.</b> Reducción del reactivo de Folin-Ciocalteu (FC) por el compuesto fenólico. ....   | 19 |
| <b>Figura 6.</b> Estructura química del patrón de ácido tánico.....   | 21 |
| <b>Figura 7.</b> Procedimiento histológico. ....  | 29 |
| <b>Figura 8.</b> Curva de calibración del patrón ácido tánico (AT). ....  | 33 |
| <b>Figura 9.</b> Contenido de taninos.....  | 35 |
| <b>Figura 10.</b> Comparación CFT v/s CT.....   | 37 |
| <b>Figura 11.</b> a) Infiltrado celular en la oreja derecha control, inflamación inducida por TPA y (b) ausencia de infiltrado en oreja izquierda a la cual no se le indujo inflamación. .... | 41 |
| <b>Figura 12.</b> Mecanismo de acción del TPA.....  | 48 |

## INDICE DE TABLAS

|  |    |
|--|----|
| <b>Tabla 1.</b> Genotipos de las hojas de <i>U. molinae</i> con su respectiva selección, código herbario y procedencia.....  | 14 |
| <b>Tabla 2.</b> Protocolo ensayo del reactivo de Folin-Ciocalteu .....   | 21 |
| <b>Tabla 3.</b> Protocolo de deshidratación.....   | 25 |
| <b>Tabla 4.</b> Protocolo de aclaramiento.....   | 26 |
| <b>Tabla 5.</b> Inclusión en parafina.....   | 26 |
| <b>Tabla 6.</b> Protocolo de hidratación .....   | 27 |
| <b>Tabla 7.</b> Protocolo de tinción .....   | 28 |
| <b>Tabla 8.</b> Protocolo de deshidratación y aclaramiento .....   | 28 |
| <b>Tabla 9.</b> Rendimiento de los extractos expresados en % p/p .....   | 31 |
| <b>Tabla 10.</b> Reacciones de identificación de taninos de los EETs de diez genotipos de <i>U.molinae</i> .....   | 32 |
| <b>Tabla 11.</b> Contenido de fenoles totales, fenoles residuales y taninos de los diez genotipos de los EETs de las hojas de murtilla.....  | 34 |
| <b>Tabla 12.</b> Comparación entre la actividad antioxidante <i>in vitro</i> de tres ensayos con el contenido de taninos de las hojas de <i>U.molinae</i> de los diez genotipos..... | 38 |

**Tabla 13.** Dosis-respuesta del porcentaje de disminución del infiltrado celular del EAE 19-1. ....41

**Tabla 14.** Dosis-respuesta del efecto antiinflamatorio por vía oral del EAE 19-1 en el modelo de inflamación inducida por TPA. ....42

**Tabla 15.** Dosis-respuesta del porcentaje de disminución del infiltrado celular del EET 31-1. ....43

**Tabla 16.** Dosis-respuesta del efecto antiinflamatorio por vía oral del EET 31-1 en el modelo de inflamación inducida por TPA. ....44

## INDICE DE ANEXOS

|   |    |
|---|----|
| <b>Anexo 1.</b> Compuestos fenólicos encontrados en los extractos etanólicos de los diez genotipos de <i>U. molinae</i> .....   | 59 |
| <b>Anexo 2.</b> Fotografías de testigos de herbario de las hojas de los diez genotipos de <i>U. molinae</i> .....   | 61 |
| <b>Anexo 3.</b> Fotografías de extracción de taninos y gelatina con FeCl <sub>3</sub> al 1% (p/v).....  | 63 |
| <b>Anexo 4.</b> Imágenes de morfología celular utilizada para el conteo celular. ....   | 65 |
| <b>Anexo 5.</b> Fotografías de las reacciones de identificación de taninos en los extractos etanólicos (EETs) de los diez genotipos de <i>Ugni molinae</i> Turcz. ....                                    | 66 |
| <b>Anexo 6.</b> Diferencias significativas entre los diez genotipos de los EETs en relación al contenido de taninos.....  | 68 |
| <b>Anexo 7.</b> Fotografías de infiltración celular de la oreja control solo con TPA y de las orejas tratadas con los extractos de hojas de murtila, de los genotipos 19-1 y 31-1 a diferentes dosis..... | 69 |
| <b>Anexo 8.</b> Resumen de asistencia a congreso. ....  | 71 |

## **ABREVIATURAS**

|        |   |
|--------|---|
| AE     | : Acetato de etilo                                    |
| AT     | : Ácido tánico  |
| COX-2  | : Ciclooxygenasa 2                                    |
| CFR    | : Contenido de fenoles residuales                     |
| CFT    | : Contenido de fenoles totales                        |
| CT     | : Contenido de taninos                                |
| DIC    | : Disminución infiltrado celular                      |
| DCM    | : Diclorometano                                       |
| DE     | : Desviación estándar                                 |
| EA     | : Efecto antiinflamatorio                             |
| EAE    | : Extracto de acetato de etilo                        |
| EAT    | : Equivalente de ácido tánico                         |
| EDCM   | : Extracto de diclorometano                           |
| EET(s) | : Extracto(s) etanólicos                              |
| EH     | : Extracto de hexano                                  |
| EROS   | : Especies reactivas de oxígeno                       |
| ETOH   | : Etanol  |
| FC     | : Folin- Ciocalteu                                    |
| ICAM-1 | : Molécula de adhesión intercelular 1                 |
| INIA   | : Instituto Nacional de Investigaciones Agropecuarias |
| iNOS   | : Óxido nítrico sintasa inducible                     |
| NF-κB  | : Factor nuclear kappa B                              |

|               |   |
|---------------|---|
| PBS           | : Buffer fosfato salino                   |
| PKC           | : Proteína quinasa C                      |
| SEM           | : Error estándar de la media              |
| TNF- $\alpha$ | : Factor de necrosis tumoral              |
| TPA           | : 12-O-tetradecanoilforbol-13-acetato     |
| VCAM-1        | : Molécula de adhesión celular vascular 1 |

## RESUMEN

La murtila es un arbusto autóctono que crece en el centro y sur de Chile. Se caracteriza por producir frutos globosos y pequeños con agradable aroma y sabor, atributo que los ha transformado en una fuente de comercio y exportación. Sus hojas han sido utilizadas por la medicina tradicional por sus propiedades antiinflamatorias y analgésicas, actividades que han sido confirmadas por investigaciones realizadas en nuestro laboratorio. Asimismo, estudios han determinado en los extractos de sus hojas, actividades antioxidante y antimicrobiana, asociadas a la presencia de compuestos fenólicos. Entre los compuestos fenólicos presentes en murtila, los taninos, derivados de ácido gálico, ácido elágico y catequina, generaron interés por su variedad de propiedades que presentan, entre las que destacan antiinflamatorias, antioxidantes, antivirales, antimicrobianas, entre otras. Además de ser metabolitos secundarios cuya cuantificación en diez genotipos de murtila no se había determinado en estudios previos en nuestro laboratorio.

Existen varios factores que pueden determinar la composición química presente en la murtila, entre los que se encuentra el genotipo. Debido a esta influencia, se determinó en forma comparativa el contenido de taninos de extractos etanólicos de hojas de diez genotipos de *Ugni molinae* Turcz, cultivadas bajo las mismas condiciones edafo-climáticas y manejo agronómico.

Por otra parte, por sus propiedades antiinflamatorias *in vivo*, determinadas en estudios previos en murtila. Se evaluó si los extractos tenían además efecto sobre la disminución de la infiltración celular a diferentes dosis. Se seleccionaron y evaluaron dos extractos: uno de acetato de etilo (genotipo 19-1) y otro etanólico (genotipo 31-1).

Los resultados obtenidos mostraron diferencias significativas ( $p < 0,05$ ), respecto al contenido de taninos entre los diez genotipos estudiados, el genotipo ZF-18 es el que presentó mayor cantidad con  $201,0 \pm 1,6$  EAT (mg/g ES).

En el ensayo de disminución del infiltrado celular, el mayor efecto se obtuvo en el extracto etanólico 31-1, a una dosis de 100 mg/kg con un 38,7%.

Los resultados obtenidos en esta investigación aportaron información relevante respecto a la influencia del genotipo en relación al contenido de taninos. Así como también a que los extractos a diferentes dosis, se encuentran influyendo en la disminución de las células que llegan a la zona de inflamación.

## ABSTRACT

### **Determination of tannin content and evaluation of cell infiltration decrease of genotypes different of *Ugni molinae* Turcz**

Murtilla is a native shrub that grows in central and southern Chile. It is characterized by produce small and globose fruits with pleasant aroma and flavor, attribute that has become a source of trade and export. Its leaves have been used by traditional medicine for its anti-inflammatory and analgesic properties, activities that have been confirmed by investigations in our laboratory. Also, studies have determined their antioxidant and antimicrobial activity, which have been associated with the presence of phenolic compounds. Among the phenolic compounds present in murtilla, tannins, derivatives of gallic acid, ellagic acid and catechin, generated interest for its variety of properties presented, among which we highlight anti-inflammatory, antioxidant, antiviral, and antimicrobial, among others. Besides being secondary metabolites which quantification in ten genotypes of murtilla there was been determined in previous studies in our laboratory.

Several factors can determine the chemical composition present in the murtilla, including the genotype. Based on this, the tannin content was determined comparatively between the ethanolic extracts of *Ugni molinae* Turcz leaves from ten genotypes, grown under the same soil and climate conditions and agronomic management.

Moreover, for its anti-inflammatory properties *in vivo* as determined in previous studies in murtilla. It was assessed whether extracts also had influence on decreasing cell infiltration at different doses. Selecting and evaluating two extracts: one of ethyl acetate (19-1 genotype) and another ethanol (31-1 genotype).

The results showed significant differences ( $p < 0.05$ ), compared to tannin content among the ten genotypes studied, genotype ZF-18 is the highest estimated amount to  $201.0 \pm 1.6$  EAT (mg /g DE).

In the assay decreased cellular infiltrate, the greatest effect was obtained in ethanolic extract 31-1, at a dose of 100 mg/kg with 38.7%.

The results obtained in this research provided relevant information regarding the influence of genotype in relation to the content of tannins. As well as extracts at different doses, are influencing the decrease of cells that reach the site of inflammation.

## I. INTRODUCCION

### 1.1 *Ugni molinae Turcz*

*Ugni molinae* Turcz es un arbusto chileno del tipo perenne, originario del centro y sur de Chile; perteneciente a la familia de las Myrtaceae. Entre sus nombres comunes se encuentran "murtilla", "murta" o "Uñi" de la lengua mapuche (Hoffmann, 1991) y en países de habla inglesa como "Chilean guava" (Montenegro, 2002).

Entre sus características físicas presenta hojas con tamaño pequeño y coriáceo (Ramírez *et al.*, 1980), de color verde oscuras en su haz y más claras en las caras inferiores. En relación a su tamaño, éste es variable, tiene una altura baja y compacta en ambientes secos y expuestos al sol, mientras que en condiciones de mayor humedad puede alcanzar hasta dos metros de altura (Montenegro, 2002). Sus frutos (**Figura 1**) se caracterizan por tener un color rojo, ser aromáticos, poseer un sabor agradable, y tener un tamaño pequeño y globoso (Ramírez *et al.*, 1980; Seguel *et al.*, 2000).



**Figura 1.** *Ugni molinae* Turcz. Familia Myrtaceae.

Su uso medicinal se remonta a orígenes indígenas, donde éstos lo utilizaban en infusiones de sus hojas para tratar disenterías y diarreas (Hoffmann, 1991). En la medicina folclórica, sus partes aéreas son empleadas por sus propiedades astringentes, estimulantes y aromáticas (Muñoz, 1981; Wilhelm, 1999), además de utilizarse para el tratamiento de enfermedades del tracto urinario por su efecto analgésico (Montenegro, 2000).

En el área cosmética los extractos de las hojas son empleados por sus propiedades descongestionantes, capacidad de regenerar la piel y reducir el estrés oxidativo ayudando en la postergación del envejecimiento (Aguirre *et al.*, 2006).

## **1.2 Metabolitos secundarios de las hojas de *u. molinae* y su actividad farmacológica.**

### **1.2.1 Triterpenoides pentacíclicos**

Estudios desarrollados en el laboratorio de Productos Naturales de la Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas de la Universidad de Chile, permitieron reconocer triterpenos pentacíclicos derivados de los núcleos ursano, oleanano y lupano, tales como: ácido ursólico, ácido oleanólico, ácido corosólico, ácido alfitólico, ácido asiático, ácido madecásico, ácido betulínico y ácido maslínico. Determinándose su actividad antiinflamatoria tópica aplicado en un modelo de ratón (Aguirre *et al.*, 2006; Goity *et al.*, 2013). Investigaciones publicadas recientemente, identificaron en los extractos de hojas de acetato de etilo (EAEs) y etanólicos (EETs) de diez genotipos de *U. molinae*, la presencia de estos triterpenos pentacíclicos. En los primeros extractos se obtuvo el mayor contenido y se determinó la presencia de los ácidos madecásico, asiático, corosólico, maslínico y mezcla de ursólico y oleanólico en todos los extractos, mientras que en los EETs se identificaron los ácidos maslínico, asiático y corosólico. En ambos extractos no se identificó el ácido betulínico, descrito en investigaciones previas en el laboratorio. Además, en este mismo estudio se realizó un ensayo comparativo del efecto

antiinflamatorio *in vivo*, en ambos extractos de los diez genotipos, no obteniéndose una correlación significativa respecto al contenido de triterpenoides, pero sí observándose una tendencia proporcional en los EAEs e inversamente proporcional en los EETs (Arancibia-Radich *et al.*, 2016).

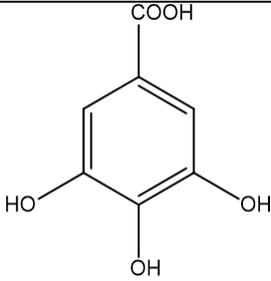
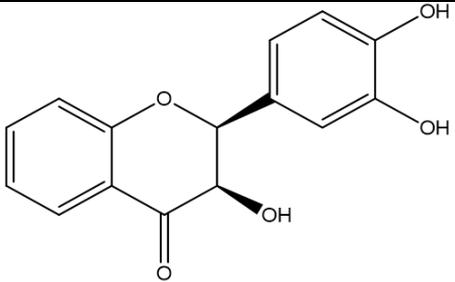
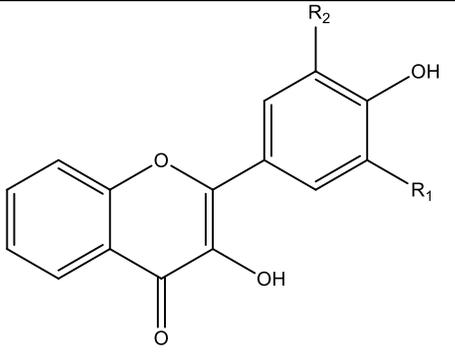
### 1.2.2 Compuestos fenólicos

Rubilar *et al.* (2006) identificaron en las hojas de *U. molinae* la presencia de compuestos fenólicos tales como: epicatequina, miricetina, glicósidos de quercetina, canferol y miricetina, ramnósido y diramnósido de quercetina y miricetina, en extractos etanólicos (EETs) y metanólicos, así como también derivados de ácido gálico en extractos acuosos (**Figura 2**). Además en esta investigación se determinó la capacidad antioxidante *in vitro* de sus hojas, asociada a la presencia de compuestos fenólicos.

Avello *et al.* (2014) investigó la composición química de extractos de hojas de murtila de dos zonas, una continental de la Región del Biobío y otra del Archipiélago de Juan Fernández. Encontrando por primera vez en los extractos metanólicos de *U. molinae* continental, derivados de ácido gálico y elágico. Además de unidades de galoil-glucosa (elagitaninos).

Estudios recientemente publicados detectaron 102 señales de compuestos fenólicos, dentro de los cuales 92 fueron tentativamente identificados en los EETs de hojas de murtila de diez genotipos. Su identificación y cuantificación se realizó por análisis de cromatografía líquida seguida de espectrometría de masa (HPLC-MS), destacando los peaks de ácido gálico, bis-HHDP-glucosa, hexósidos (glicósidos) de miricetina, galoil-quercetina y quercetina; miricetina, quercetina y ramnósido de miricetina. Siendo éste último compuesto, el con mayor presencia en los EETs. Además en estos extractos se determinó la capacidad antioxidante *in vitro* a través de tres ensayos, siendo ésta correlacionada directamente con el contenido total de fenoles presentes (Peña-Cerda *et al.*, 2016). La totalidad de compuestos identificados, se pueden ver en detalle en **Anexo 1**.

Avello y Pastene (2005) y Rubilar *et al.* (2011), determinaron también la capacidad antioxidante *in vivo* e *in vitro* respectivamente, en las hojas de murtila, asociada a la presencia de compuestos fenólicos.

| Nombre                                   | Estructura   |
|--|--|
| Ácido gálico                             |    |
| Epicatequina                             |   |
| Miricetina ( $R_1 = -OH$ ; $R_2 = -OH$ ) |  |
| Quercetina ( $R_1 = -H$ ; $R_2 = -OH$ )  |  |
| Canferol ( $R_1 = -H$ ; $R_2 = -H$ )     |  |

**Figura 2.** Compuestos fenólicos, que se encuentran solos o como derivados en las hojas de murtila.

Además, investigaciones aportaron información respecto al efecto antinoceptivo asociado a la presencia de sus compuestos fenólicos y triterpenos. Demostrando que los diferentes extractos de hojas (diclorometano, acetato de etilo y etanol) mostraban efecto dosis-dependiente en diferentes test de dolor, resultados que validan el uso tradicional de sus hojas por su efecto analgésico (Delporte *et al.*, 2007).

También se determinó el efecto protector de los extractos de murtila, sobre el daño oxidativo en los eritrocitos. Al tratar estas células con ácido hipocloroso un potente oxidante, los extractos fueron capaces de contrarrestar el efecto, disminuyendo la lisis de los eritrocitos (Suwalsky *et al.*, 2007).

Avello *et al.* (2009), determinaron que los extractos de hojas poseían propiedad antimicrobiana frente a microorganismos como *Pseudomonas aeruginosa*, *Enterobacter aerogenes*, *Staphylococcus aureus* y *Candida albicans*. Actividad asociada a la presencia de compuestos fenólicos y saponinas.

### 1.2.3 Taninos

Entre los metabolitos secundarios, presentes en murtila encontramos los taninos, quienes fueron definidos por primera vez por Bate-Smith y Swain en 1962 como: “Compuestos fenólicos, solubles en agua, con pesos moleculares entre 500 y 3000 Da, los cuales dan reacciones fenólicas usuales, y además tienen propiedades especiales, como la habilidad de precipitar alcaloides, gelatina y otras proteínas”. Además se caracterizan por poseer en su estructura de 12 a 16 grupos fenólicos, 5-7 anillos aromáticos por cada 1.000 unidades de masa molecular y poseer la propiedad de complejación, denominada como astringencia (Haslam, 1996).

Estos metabolitos secundarios se encuentran distribuidos en varios sectores del reino de las plantas superiores. Algunas de las familias en las que se encuentran son: Leguminosae, Rosaceae, Polygonaceae, Fagaceae, Rhyzophoraceae, Melastometaceae y Myrtaceae (Okuda *et al.*, 1990).

Entre las funciones que cumplen los taninos en el reino vegetal tenemos: ayudar en la regulación del crecimiento de las plantas, además de protegerlas de animales depredadores por sus características astringentes, generando que las especies vegetales sean no comestibles (Ky *et al.*, 2016).

Dentro de su clasificación se distinguen los siguientes grupos:

**Taninos hidrolizables:** Son poliésteres compuestos por ácidos orgánicos y un azúcar o un polialcohol. Cuya denominación se debe a que al ser tratados con ácidos diluidos, éstos son capaces de generar un rompimiento hidrolítico. Su azúcar principal es la glucosa, sin embargo, también se puede observar la presencia de xilosa, fructuosa y sacarosa.

Dependiendo del ácido que los conforma encontramos los galotaninos en presencia de ácido gálico y los elagitaninos, compuestos por ácido elágico, el cual se forma como mezcla de los ácidos gálico y hexahidroxidifénico (Serrano *et al.*, 2009).

**Taninos condensados o proantocianidinas:** Son polímeros donde la unidad estructural es el núcleo de flavan-3-ol, tales como catequina y/o epicatequina y epigallocatequina. Formados por la unión de dos a seis unidades, los cuales se unen en posición del carbono 4 y 8 (Haslam, 1996).

Entre sus actividades descritas para los taninos, encontramos que actúan como antioxidantes; inhibiendo procesos como la peroxidación lipídica. Actúan como antiinflamatorios, antivirales, antimicrobianos, antitumorales, cardioprotectores, inhibidores de enzimas relacionadas con la diabetes ( $\alpha$ -amilasa y  $\alpha$ -glucosidasa), inmunomoduladores, antidiarreicos asociado a la astringencia, entre otras. Además se reportan efectos antinutricionales debido a que se complejan con ciertas enzimas asociadas a la digestión y absorción de nutrientes (Scalbert, 1991; Haslam, 1996; Serrano *et al.*, 2009).

### 1.3 Inflamación

La inflamación se define como una reacción local del tejido vascular, en respuesta a un agente externo que provoca daño del tejido.

En esta respuesta inflamatoria los componentes implicados son la microcirculación, células sanguíneas, el plasma y células del tejido conectivo, los cuales tienen la misión de localizar, eliminar o aislar el agente injuriante y tejido que ha sido dañado, para luego repararlo por mecanismos regenerativos o cicatrizantes.

La inflamación se clasifica en aguda y crónica; y entre las manifestaciones externas de la respuesta inflamatoria, encontramos los signos clínicos de tumor (edema), rubor, dolor, calor y pérdida de la función del tejido, producidas como consecuencia de la elaboración de mediadores químicos y el daño mediado por los leucocitos.

Entre las etapas de la respuesta inflamatoria encontramos: reconocimiento del agente que causa la lesión, reclutamiento de leucocitos, retirada o eliminación del agente, regulación de la respuesta y resolución (reparación) (Kumar *et al.*, 2008).

#### 1. Inflamación aguda: Está compuesta por dos procesos:

a) Cambios vasculares: Una vez ocurrida la lesión o infección, se produce la liberación de mediadores químicos, tales como histamina, serotonina, prostaglandinas, entre otros. Éstos generan una vasoconstricción transitoria de segundos seguida de una vasodilatación arteriolar, la cual produce un aumento de sangre localizada, presión hidrostática intravascular, enrojecimiento (eritema) y calor. Provocando un aumento en la permeabilidad microvascular y en consecuencia, el paso de líquido rico en proteínas, agua, iones y algunas células hacia el espacio extravascular. Este conjunto de componentes recibe el nombre de exudado.

Una vez que el líquido extravascular comienza a acumularse recibe el nombre de edema (Kumar *et al.*, 2008).

b) Procesos celulares: Forman parte el reclutamiento y activación de leucocitos.

El reclutamiento de leucocitos está formado por las siguientes etapas:

*Marginación:* Etapa inicial, en la cual producto de la disminución en la velocidad de la circulación, los leucocitos son empujados fuera del eje central, permitiéndoles interactuar con las células endoteliales y dirigirse a la periferia donde comienzan acumularse.

*Rodamiento:* Como su nombre lo indica, una vez que los leucocitos llegan a la periferia, comienzan a rodar a través de la estructura endotelial, donde se adhieren transitoriamente. Este proceso está mediado por receptores expresados tanto en leucocitos como endotelio, denominados selectinas, de las cuales se reconocen tres: selectina E (CD62E), expresada en las células endoteliales; selectina P (CD62P), presentes en endotelio y plaquetas; y una selectina L (CD62L), expresadas en la superficie de los leucocitos.

*Adhesión:* En esta etapa los leucocitos se adhieren fuertemente a las células endoteliales, a través de integrinas, las cuales son glucoproteínas heterodímeras transmembrana, compuestas por dos cadenas  $\alpha$  y  $\beta$ . Éstas se expresan en la membrana plasmática de las células blancas, las que interactúan con ligandos presentes en el endotelio. Esta unión ocurre cuando se activan los leucocitos por parte de citoquinas liberadas desde el sitio de inflamación y que se muestran junto al endotelio, aumentando la afinidad entre ellos. Dentro de estas integrinas se encuentran LFA-1 (CD11a/ CD18) y Mac-1 (CD11b/CD18), unidas al ligando molécula de adhesión intercelular 1 (ICAM-1); y la integrina VLA-4 que se une a la molécula de adhesión celular vascular 1 (VCAM-1).

*Transmigración:* Una vez detenidos y adheridos, los leucocitos comienzan a migrar a través de la pared vascular, principalmente entre las uniones intercelulares, proceso conocido como diapédesis. Un mediador que ayuda a que se produzca esta etapa es la

molécula de adhesión expresada en leucocitos y células endoteliales (PECAM-1 o CD31) (Kumar *et al.*, 2008; Vestweber, 2015).

Una vez fuera del vaso sanguíneo, comienza el proceso de quimiotaxis, los que mediante mediadores externos o endógenos permiten que los leucocitos, en su mayoría neutrófilos, se dirijan hacia el tejido. Entre estos mediadores encontramos las citoquinas, dentro de las cuales, las más importantes en la inflamación aguda son el factor de necrosis tumoral (TNF- $\alpha$ ) y la interleuquina 1 (IL1), también quimiocinas y productos bacterianos, entre otros (Kumar *et al.*, 2008).

La activación de leucocitos se produce con el fin de que ellos cumplan sus funciones una vez que llegan al sitio de inflamación, por acción de distintos mediadores químicos. En consecuencia se expresan receptores tipo Toll (TLR), que permiten que se detecten los microbios o sustancias extrañas y se generen las respuestas para su eliminación. Esta respuesta comprende la fagocitosis de las partículas, producción de sustancias, tales como especies reactivas de oxígeno y nitrógeno y producción de enzimas lisosómicas que destruyen y eliminan las sustancias fagocitadas; y producción de mediadores que amplifican la respuesta inflamatoria (Kumar *et al.*, 2008).

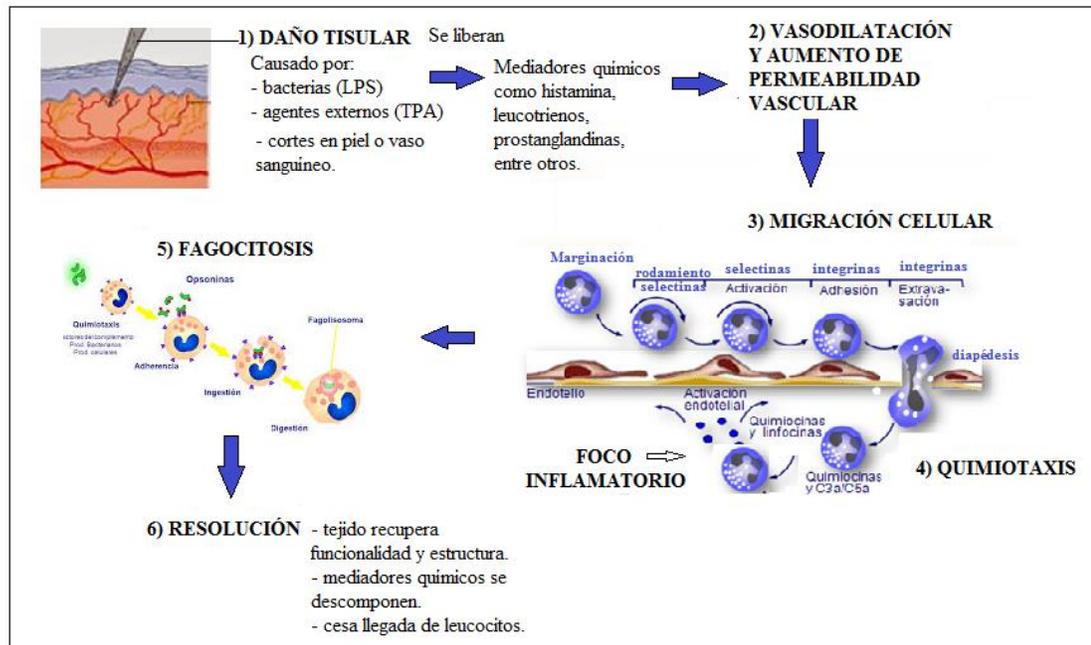
Finalmente la inflamación finaliza ocurriendo uno de los tres siguientes procesos:

Resolución, en la cual si el daño no ha sido irreversible, el tejido vuelve a recuperar su funcionalidad y estructura. El proceso se neutraliza, los mediadores químicos se descomponen, se normaliza la permeabilidad vascular y cesa la llegada de los leucocitos, dándoles muerte por apoptosis.

Inflamación crónica, la cual ocurre cuando permanece el agente causal, luego de una inflamación aguda; el daño progresa causando deterioro en los tejidos, proliferación de vasos sanguíneos, hasta producir fibrosis y necrosis.

Fibrosis o cicatrización, la cual se produce cuando el daño del tejido es sustancial o los tejidos afectados no pueden regenerarse, formándose abscesos y generando finalmente cambios estructurales irreversibles (Kumar *et al.*, 2008).

A continuación, en la **figura 3** se presenta un esquema del proceso inflamatorio.



**Figura 3.** Esquema del proceso inflamatorio.

LPS: lipopolisacáridos. TPA: 12-O-tetradecanoilforbol-13-acetato.

#### **1.4 Variabilidad genética de *U. molinae***

Estudios realizados por Seguel *et al.* (2000), en el cual se hizo una genotipificación a partir de microsatélites y caracterización molecular por ADN amplificado al azar. Se recolectaron 100 accesiones aproximadamente de germoplasma en 36 localidades entre la VII y X región en el año 1996, de las cuales se demostró la alta variabilidad genética presente en la murtila.

Debido a esta variabilidad y con el objetivo de ver la influencia del genotipo respecto al contenido de taninos, metabolitos secundarios aún no cuantificados en estudios previos en el laboratorio. Es que en esta memoria, en una primera etapa se determinó en forma comparativa la cantidad de taninos en los extractos etanólicos (EETs) de hojas de diez genotipos, seleccionados por cantidad de hojas y calidad de sus frutos; cultivados bajo las mismas condiciones edafo-climáticas y manejo agronómico. Y en segundo lugar se realizó un estudio farmacológico de dos extractos de murtila (acetato de etilo y etanólico), donde se evaluó la disminución del infiltrado celular.

## **II. HIPÓTESIS**

- El contenido de taninos depende del genotipo.
- La actividad antiinflamatoria de las hojas de murtila está asociada a una disminución del infiltrado celular.

## **III. OBJETIVOS**

### **3.1 OBJETIVO GENERAL**

- Determinar en forma comparativa la presencia y cantidad de taninos de los extractos etanólicos (EETs) de las hojas de diez genotipos de murtila.
- Determinar el porcentaje de disminución de la infiltración celular de un extracto de hoja etanólico y otro de acetato de etilo, de dos genotipos seleccionados, con actividad antiinflamatoria *in vivo*.

### **3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

- Determinar la presencia y contenido de taninos en los EETs de las hojas de diez genotipos de murtila, cultivados en las mismas condiciones edafo-climáticas e igual manejo agronómico.
- Evaluar la disminución del infiltrado celular de dos extractos uno EAE 19-1 y otro EET 31-1 de las hojas de murtila, mediante el recuento celular en el sitio inflamado.
- Relacionar los resultados del efecto antiinflamatorio con los de la disminución de la infiltración celular de los genotipos en estudio.

## **IV. MATERIALES Y MÉTODOS**

### **4.1 REACTIVOS**

**Reacciones de coloración:**  $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  (Fisher Scientific Company, USA), HCl al 37% (v/v), sulfato de amonio férrico dodecahidratado  $[(\text{NH}_4) \text{Fe}(\text{SO}_4)_2 \cdot 12\text{H}_2\text{O}]$ ,  $\text{CH}_3\text{COONa}$  adquiridos en Merck (Alemania) y formalina 37% (v/v).

**Cuantificación de taninos:** gelatina para microbiología, NaCl, Reactivo de Folin-Ciocalteu (FC) adquiridos en Merck (Alemania), patrón ácido tánico de Sigma-Aldrich (USA) y  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  (Droguería Michelson).

**Infiltración celular:** PBS (buffer fosfato salino pH 7,4), etanol p.a., Neo-Mount® (adquiridos en Merck, Alemania), parafina sólida (Heyn), eosina amarillenta para microscopía (Winkler), xileno p.a. (Chemix), solución de hematoxilina modificada de Harris y paraformaldehído adquiridos en Sigma-Aldrich (USA).

Para la preparación de soluciones se utilizó agua destilada y etanol 96% grado técnico.

### **4.2 RECOLECCIÓN Y OBTENCIÓN DEL MATERIAL VEGETAL**

El material vegetal se obtuvo a partir de diez accesiones adquiridas desde el banco de germoplasma del Instituto de Investigaciones Agropecuarias (INIA), en Carillanca, Temuco. Los diez genotipos de hojas de murtillo fueron cultivados bajo las mismas condiciones edafo-climáticas y manejo agronómico. Las muestras se recolectaron en el mes de Mayo del año 2013, una vez que fueron recolectados los frutos.

Para la recolección de las hojas se consideraron dos criterios de selección:

- cinco genotipos por la calidad de frutos
- cinco genotipos por la cantidad de sus hojas

Cabe mencionar que todos los estudios se hicieron en los extractos de las hojas de *U.molinae*.

En la **Tabla 1** se presentan los antecedentes de cada genotipo, en relación a procedencia, criterio de selección y número de herbario. En la Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas de la Universidad de Chile se encuentran los testigos de herbario de cada genotipo, los cuales se pueden observar en el **Anexo 2**.

**Tabla 1.** Genotipos de las hojas de *U. molinae* con su respectiva selección, código herbario y procedencia.

| Genotipo           | Criterio de selección | Código de herbario | Procedencia           |
|--------------------|-----------------------|--------------------|-----------------------|
| 8-2                | Cantidad de hojas     | SQF 22571          | Cauquenes, VII Región |
| 14-4               | Cantidad de hojas     | SQF 22549          | Purén, IX Región      |
| 19-1               | Cantidad de hojas     | SQF 22554          | Porma, IX Región      |
| 19-1 <sup>ha</sup> | Cantidad de hojas     | SQF 22553          | Porma, IX Región      |
| ZF-18              | Cantidad de hojas     | SQF 22550          | Putique, X Región     |
| 19-2 <sup>F</sup>  | Calidad de frutos     | SQF 22557          | Porma, IX Región      |
| 22-1 <sup>F</sup>  | Calidad de frutos     | SQF 22552          | Mehuín, XIV Región    |
| 23-2 <sup>F</sup>  | Calidad de frutos     | SQF 22556          | Queule, IX Región     |
| 27-1 <sup>F</sup>  | Calidad de frutos     | SQF 22555          | Aucar, X Región       |
| 31-1 <sup>F</sup>  | Calidad de frutos     | SQF 22551          | Lenca, X Región       |

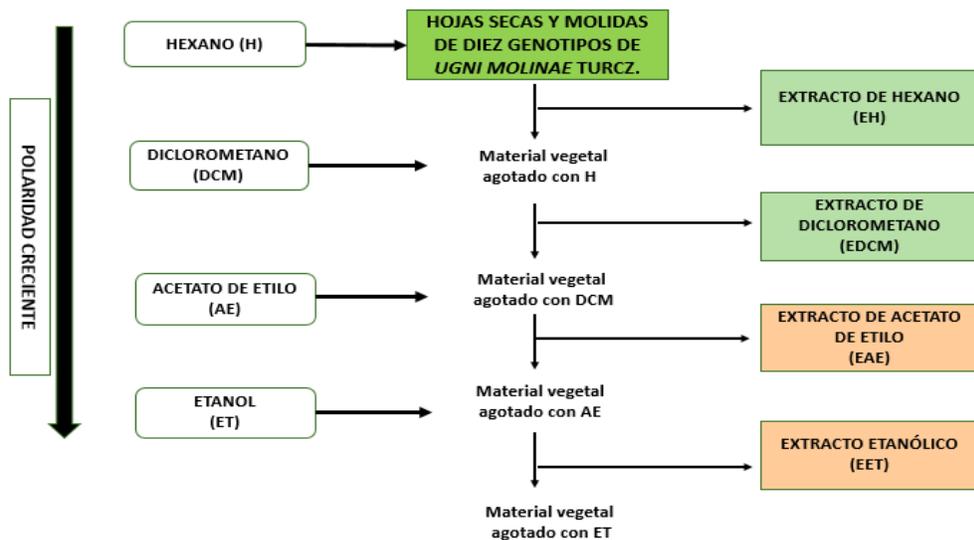
Los genotipos de hojas con el superíndice F, indican los seleccionados por su calidad de frutos. Los cinco genotipos restantes fueron seleccionados por la cantidad de sus hojas, en relación a su producción.

## 4.3 ESTUDIO QUÍMICO

### 4.3.1 Obtención de los extractos a evaluar

A partir de hojas secas, molidas y pesadas de cada uno de los diez genotipos, se procedió a realizar una extracción seriada con solventes de polaridad creciente en el siguiente orden: hexano, diclorometano, acetato de etilo y etanol. Obteniéndose los extractos: de hexano (EH), de diclorometano (EDCM), de acetato de etilo (EAE) y etanólico (EET), respectivamente (**Figura 4**). En cada etapa de extracción se fue agotando el material vegetal y concentrando los extractos mediante un rotavapor a presión reducida.

Una vez obtenidos cada uno de los extractos, éstos fueron secados a 30°C a través de una corriente de aire caliente, molidos, rotulados y almacenados a temperatura ambiente en frascos de plástico.



**Figura 4.** Esquema de extracción de las hojas de *U. molinae*.

En esta investigación se cuantificó el contenido de taninos de diez genotipos de los EETs de las hojas de murtila y se evaluó la disminución del infiltrado celular en el EAE del genotipo 19-1 y el EET del genotipo 31-1, el primero fue seleccionado por tener una variedad de sus frutos de importancia comercial y presentó efecto antiinflamatorio, y el segundo por mejor efecto antiinflamatorio *in vivo*.

#### **4.3.2 Estudio cualitativo**

- **Identificación de la presencia de taninos hidrolizables y condensados**

Las técnicas cualitativas permiten determinar la presencia o ausencia de una gran variedad de metabolitos secundarios presentes en las plantas. En este caso para identificar la presencia de taninos gálicos o hidrolizables y taninos catéquicos o condensados se llevaron a cabo las siguientes reacciones de coloración.

A partir de los diez genotipos de los EETs al 1% (p/v), disueltas en etanol/agua 80% (v/v); se realizaron las siguientes reacciones:

##### **a) Reacción con tricloruro férrico ( $\text{FeCl}_3$ ):**

- Se tomaron 3 mL de cada EETs de murtila y se colocaron en tubos de ensayo.
- Se agregó gota a gota una solución de  $\text{FeCl}_3$  al 1% (p/v) observando coloración.

##### **b) Reacción de Stiasny:**

- Se colocó 3 mL de cada EETs en tubos de ensayo.
- Se agregaron 2 mL de reactivo de Stiasny, compuesto por HCl al 37% (v/v) y formalina al 37% (v/v); y se llevó a ebullición durante 15 min. Observando formación y coloración del precipitado que indicaron la presencia de taninos catéquicos.

- Se filtraron cada una de las muestras y se tomaron 3 mL del filtrado, se agregó 1 mL de alumbre férrico al 1% (p/v) y 3 g de acetato de amonio. Se observó coloración indicando presencia de taninos hidrolizables.

**c) Reacción de oxidación** (formación de flobáfenos)

- A 3 mL de cada uno de los EETs se agregó 1 mL de HCl al 37% (v/v) y se calentó a ebullición.
- Se observó coloración que indica presencia de taninos catéquicos que se oxidan y condensan para dar formación al flobáfeno (Aguirre, 2007).

**4.3.3 Estudio cuantitativo: Determinación del contenido de taninos (CT)**

Este análisis se realizó mediante el método indirecto modificado según (Lastra *et al.*, 2000; Doll *et al.*, 2012). El procedimiento se llevó a cabo en dos etapas principales:

**a) Extracción de los taninos de la muestra**

**Procedimiento:**

- 1) Se prepararon soluciones de cada genotipo de los EETs a una concentración de 10 mg/mL, disueltas en metanol.
- 2) Se prepararon y mezclaron las siguientes soluciones:
  - 5 mL de gelatina al 20 % (p/v)
  - 10 mL de solución saturada de NaCl al 35,9% (p/v)
- 3) Se pesó 1 g de caolín en un matraz de 25 mL, agregándose luego la solución de EET preparada en el paso 1. Aforándose con la mezcla realizada en el paso 2.
- 4) Con la mezcla obtenida en el matraz de 25 mL, se procede a agitar durante 30 min con un agitador magnético, con el fin de permitir mayor contacto entre la solución del extracto, gelatina y caolín, generando la precipitación de los taninos.

- 5) Una vez transcurrido el tiempo el contenido de esta mezcla fue transferido a un tubo falcon de 50 mL y centrifugado a 4000 rpm durante 10 min.
- 6) El centrifugado obtenido se filtra con un papel Whatman N°4 (para precipitados del tipo gelatinoso), separando el sobrenadante del precipitado.
- 7) Al sobrenadante obtenido anteriormente se le realizaron diluciones, debido al exceso de gelatina aún presente en él; con el propósito de no generar interferencias posteriores.

Para esto, se tomaron 4 mL de sobrenadante y 6 mL de etanol (1<sup>era</sup> dilución), la que fue centrifugada a 4000 rpm por 15 min y posteriormente filtrada. Separando el sobrenadante del precipitado

- 8) Se realizó una 2<sup>da</sup> dilución tomando 4 mL de sobrenadante obtenido en la etapa anterior y 6 mL de etanol siendo colocada en frío (4°C) durante 24 h y posteriormente filtrada, obteniéndose la solución final libre del CT.

Finalmente para corroborar la extracción óptima de los taninos, se realizó una reacción colorimétrica con FeCl<sub>3</sub> al 1% (p/v), a las disoluciones del proceso de extracción. Que se pueden observar en el **Anexo 3**.

#### **b) Cuantificación del contenido de fenoles totales (CFT) y fenoles residuales (CFR)**

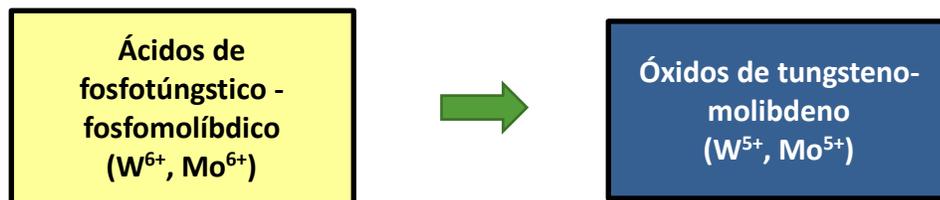
Mediante el método espectrofotométrico de coloración del reactivo Folin-Ciocalteu (FC) adaptado de Cicco *et al.* (2009) e implementado por Valenzuela-Bustamante (2015) y Peña-Cerda *et al.* (2016), se determinaron los CFT y CFR.

Por diferencia de las concentraciones de ambos fenoles se obtuvo el contenido de taninos:

$$CT = CFT - CFR$$

### Fundamento del ensayo:

Los compuestos fenólicos reaccionan con el reactivo de FC bajo condiciones básicas (ajustada con solución de  $\text{Na}_2\text{CO}_3$ ,  $\text{pH} > 10$ ), produciendo la disociación del protón fenólico y formación del anión fenolato, el cual es capaz de reducir el reactivo de FC (mezcla de los ácidos fosfotúngstico ( $\text{H}_3\text{PW}_{12}\text{O}_{40}$ ) y fosfomolibdico ( $\text{H}_3\text{PMo}_{12}\text{O}_{40}$ ) a óxidos azules de tungsteno ( $\text{W}_8\text{O}_{23}$ ) y molibdeno ( $\text{Mo}_8\text{O}_{23}$ ); pasando de color amarillo a azul (**Figura 5**). Este proceso ocurre a través de transferencia de electrones (Huang *et al.*, 2005).



**Figura 5.** Reducción del reactivo de Folin-Ciocalteu (FC) por el compuesto fenólico.

### Procedimiento (Tabla 2)

#### a) Para determinar el CFT:

- 1) Se prepararon soluciones madres entre 300-600  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , disueltas en etanol-agua 80% (v/v) para los diez genotipos de EETs de murtilla.
- 2) Las soluciones anteriores se determinaron a concentraciones finales entre 30-60  $\mu\text{g}/\text{mL}$  (volumen final de 300  $\mu\text{L}$  en el pocillo), con el fin de obtener absorbancias entre la linealidad según la ley de Beer.
- 3) Se colocaron 30  $\mu\text{L}$  de las soluciones de EETs y 30  $\mu\text{L}$  del reactivo FC al 10% (v/v), en el pocillo de microplaca, luego se agitó por 10 s y se incubó por 2 min a 40°C.

- 4) Transcurrido el tiempo se agregaron 240  $\mu\text{L}$  de  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  al 5% (p/v), se agitó por 10 s y se incubó por 20 min a  $40^\circ\text{C}$ .
- 5) Al finalizar el tiempo se leyó a una longitud de onda de 700 nm.

**b) Para determinar el CFR:**

- 1) De las soluciones obtenidas de los sobrenadantes en la etapa de extracción de taninos, para cada uno de los EETs se prepararon soluciones de volumen final 1000  $\mu\text{L}$  en un eppendorf, en una proporción 80:20 (800  $\mu\text{L}$  sobrenadante y 200  $\mu\text{L}$  de agua destilada).
- 2) Se colocaron 30  $\mu\text{L}$  de las soluciones de EETs y 30  $\mu\text{L}$  del reactivo FC al 10 % (v/v), en el pocillo de microplaca, luego se agitó por 10 s y se incubó por 2 min a  $40^\circ\text{C}$ .
- 3) Transcurrido el tiempo se agregaron 240  $\mu\text{L}$  de  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  al 5% (p/v), se agitó por 10 s y se incubó por 20 min a  $40^\circ\text{C}$ .
- 4) Al finalizar el tiempo se leyó a una longitud de onda de 700 nm

Para ambas lecturas se utilizó un lector de microplacas Thermo Scientific, modelo Multiskan GO.

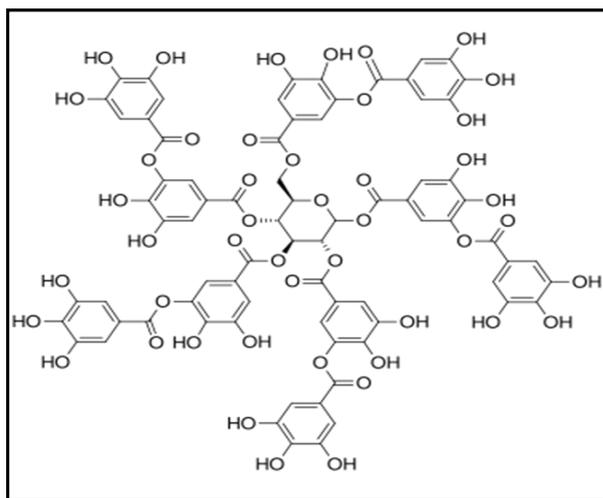
**Tabla 2.** Protocolo ensayo del reactivo de Folin-Ciocalteu

| REACTIVOS                                       | MUESTRA | BLANCO |
|---|---------|--------|
| EET disuelto en ETOH/H <sub>2</sub> O 80% (v/v) | 30 µL   | -----  |
| ETOH /H <sub>2</sub> O 80% (v/v)                | -----   | 30 µL  |
| Reactivo de FC 10 % (v/v)                       | 30 µL   | 30 µL  |
| Agitar por 10 s e incubar por 2 min a 40 °C     |         |        |
| Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> 5% (p/v)        | 240 µL  | 240 µL |
| Volumen final                                   | 300 µL  | 300 µL |
| Agitar por 10 s e incubar por 20 min a 40 °C    |         |        |
| Leer a 700 nm                                   |         |        |

EET: extracto etanólico. FC: Folin-Ciocalteu. ETOH: etanol.

Previamente a estas etapas se elaboró una curva de calibración con el patrón de ácido tánico (AT) (**Figura 6**), que se realizó bajo las mismas condiciones del protocolo de la reacción de FC y fluctuaron entre las concentraciones de 3-9 (µg/mL). Las muestras y el patrón fueron ensayados en triplicado.

En esta curva se interpolaron las absorbancias del CFT y CFR de cada uno de los diez genotipos de EETs, obteniéndose por diferencia el CT, expresados en mg equivalentes de AT por g de extracto seco (ES).



**Figura 6.** Estructura química del patrón de ácido tánico.

#### **4.3.4 Análisis estadístico**

Los resultados obtenidos fueron analizados mediante el test de ANOVA de una vía, seguido de un ensayo de comparaciones múltiples de Tukey que permitió obtener la significancia y diferencias entre genotipos, empleando el software GraphPad Prism® para Windows versión 6.01.

Para correlacionar resultados se utilizó el coeficiente de Pearson ( $r$ ).

## 4.4 ESTUDIO FARMACOLÓGICO

### 4.4.1 Disminución del infiltrado celular inducido por TPA

#### a) Obtención de las muestras

Para determinar el número de células en el sitio inflamado se realizó previamente un ensayo *in vivo* en el que se indujo edema en la oreja derecha de ratón con 12-O-tetradecanoilforbol-13-acetato (TPA), agente que induce inflamación. Su aplicación tópica genera un edema agudo con infiltración celular del tipo leucocitaria (Ban *et al.*, 2009).

En la oreja izquierda solo fue aplicado el vehículo acetona. Los extractos (EAE 19-1 y EET 31-1) fueron administrados a diferentes dosis mediante una sonda nasogástrica, luego de haber aplicado el TPA. Las dosis utilizadas para el EAE 19-1 fueron 50, 100, 150 mg/kg, mientras que para EET 31-1 fueron de 50, 100 y 300 mg/kg. Se utilizaron 8 ratones por cada dosis evaluada y 16 ratones controles.

Después de 6 h desde la aplicación del TPA, los animales fueron sacrificados por dislocación cervical. Luego, se extrajo un disco de muestra de 6 mm tanto de la oreja izquierda como de la derecha de cada animal utilizando un sacabocado.

A partir de las muestras obtenidas desde la zona inflamada se realizó un recuento celular tanto en los animales tratados como controles.

Los genotipos de los extractos de hojas a evaluar fueron escogidos por:

- EAE 19-1: Genotipo del cual a partir de un mejoramiento genético, se obtuvo una variedad de frutos registrada y comercializada, denominada “Red Pearl” por el INIA.
  
- EET 31-1: Genotipo seleccionado con mejor efecto antiinflamatorio *in vivo* vía oral, a dosis única de 200 mg/kg (Arancibia-Radich *et al.*, 2016).

## **b) Protocolo histológico**

Las muestras fueron sometidas a la técnica histológica modificada (Ross y Wojciech, 2007) que consta de las siguientes etapas:

- 1) Fijación:** Esta etapa inicial es fundamental, ya que el fin del uso de estos químicos es detener la vida de las células e impedir cambios; de esta forma se mantiene la estructura morfológica ya sea de células o tejidos que se quieren observar. Lo importante fue sumergir las muestras extraídas de manera inmediata. En este caso se utilizó una solución de paraformaldehído al 4% (p/v). Las muestras fueron sumergidas en esta solución durante 24 h y almacenadas a 4°C.

**Preparación paraformaldehído al 4% (p/v):** Para 250 mL de solución se necesitaron 10 g de paraformaldehído, 3 pellets de NaOH y 250 mL PBS pH 7,4. Se agregó 200 mL de PBS y calentó a 60°C, mientras se agitó se agregaron los pellets de NaOH. Una vez enfriado a 4°C se ajustó a pH 7,4 con HCl. Finalmente se completó hasta un volumen de 250 mL con PBS.

- 2) Lavado:** El propósito fue eliminar el fijador de las muestras impidiendo que los tejidos se endurecieran en exceso o que se generaran modificaciones. Así se evitó que no se obtuvieran secciones de tejido delgadas y una coloración correcta de los componentes celulares a observar. Transcurrido el tiempo de fijación se realizaron 3 lavados de un min cada uno con PBS, para cada muestra y se dejaron almacenados en ésta a 4°C.
- 3) Deshidratación:** Se realizó con el fin de extraer el agua presente en la muestra. Esta fue pasada por soluciones de etanol (ETOH) de concentraciones crecientes hasta alcanzar el alcohol absoluto. El proceso bien realizado permite que la

parafina sea incluida en los tejidos de manera óptima y genere la dureza necesaria para realizar los cortes.

En la **Tabla 3** se detalla el protocolo utilizado. Es recomendable agitar durante el tiempo que esté la muestra inmersa en cada solución, con el fin de lograr el impregnado en cada una. Este aumento gradual de las concentraciones se realizó con el fin de que la muestra no sufriera daños. El tiempo utilizado se adecua al tamaño de la muestra, éste se puede aumentar o disminuir según necesidad.

**Tabla 3.** Protocolo de deshidratación

| Concentraciones de ETOH          | Tiempo (min) |
|----------------------------------|--------------|
| ▪ 1 lavado de ETOH 70%           | 30           |
| ▪ 1 lavado de ETOH 90%           | 30           |
| ▪ 1 lavado de ETOH 96%           | 30           |
| ▪ 1 lavado de ETOH 100% absoluto | 30           |
| ▪ 1 lavado de ETOH 100% absoluto | 30           |

ETOH: etanol

- 4) **Aclaramiento:** Si bien en la etapa anterior se logró eliminar el agua de las muestras. La parafina no es soluble en etanol, por lo que debió reemplazarse por una sustancia miscible en alcohol y parafina. En este caso se utilizó xilol. **Tabla 4.**

**Tabla 4.** Protocolo de aclaramiento

| Reactivos                                | Tiempo (min) |
|--|--------------|
| ▪ 1 lavado de ETOH 100 % con xilol (1:1) | 30           |
| ▪ 1 lavado de xilol I                    | 30           |
| ▪ 1 lavado de xilol II                   | 30           |

ETOH: etanol

- 5) **Inclusión en parafina:** En esta etapa se produjo la formación del bloque de parafina que otorgó la dureza necesaria para realizar los cortes. Se utilizó parafina sólida, la cual fue fundida por sobre 2°C de su punto de fusión (60-65°C). Se realizaron 3 lavados con parafina de volúmenes decrecientes quedando la muestra totalmente embebida (**Tabla 5**).

**Tabla 5.** Inclusión en parafina

| Lavados de parafina   | Tiempo (min) |
|---|--------------|
| ▪ 1 <sup>er</sup> lavado de parafina (muestras colocadas en 3 mL) | 30           |
| ▪ 2 <sup>do</sup> lavado de parafina (muestras colocadas en 3 mL) | 30           |
| ▪ 3 <sup>er</sup> lavado de parafina (muestras colocadas en 2 mL) | 30           |

Una vez terminados los lavados se llenaron los moldes de papel con parafina. Primero a la mitad con el fin de colocar la muestra en posición correcta para realizar los cortes, y luego llenándolos completamente. Se dejaron enfriar a temperatura ambiente hasta que la parafina se solidificó.

- 6) **Cortes histológicos:** Con los bloques sólidos y listos se procedió a realizar los cortes transversales de un grosor de 15 µm en un micrótopo de rotación. Estos fueron colocados en un portaobjetos con adhesivo de Mayer.

- 7) **Aclaramiento:** Con los cortes listos se eliminó la parafina para una posterior tinción, la cual es soluble en agua. Para esto se realizaron dos lavados en xilol de 30 min cada uno.
- 8) **Hidratación:** Como se indicó en etapas anteriores donde se extraía de la muestra el agua. En este caso es el procedimiento contrario con el fin de que las tinciones que se prepararon en agua pudieran entrar y colorear los tejidos y células de manera óptima. Se sumergieron las muestras por concentraciones decrecientes de alcoholes. El tiempo empleado fue menor, ya que la muestra ha disminuido de tamaño respecto a lo inicial. (**Tabla 6**).

**Tabla 6.** Protocolo de hidratación

| Concentraciones de ETOH          | Tiempo (min) |
|----------------------------------|--------------|
| ▪ 1 lavado de ETOH 100% absoluto | 5            |
| ▪ 1 lavado de ETOH 96%           | 5            |
| ▪ 1 lavado de ETOH 70%           | 5            |
| ▪ 1 lavado de ETOH 50 %          | 5            |

ETOH: etanol

- 9) **Tinción:** En esta etapa se le dio coloración a las células, ya que la parafina es incolora y no permite una observación clara. Se utilizó una tinción de hematoxilina y eosina, siendo la más utilizada en histología. La hematoxilina es una tinción que se considera básica, la cual reacciona con componentes aniónicos como el ADN del núcleo. La estructura teñida por el colorante se denomina basófila.

La eosina es una tinción del tipo ácido, la cual reacciona con componentes catiónicos de las células y tejidos en especial grupos aminos de las proteínas. En este caso se utilizó para teñir el citoplasma con el fin de dar contraste. La estructura teñida se denomina acidófila. En la **Tabla 7** se observa el protocolo

empleado.

**Tabla 7.** Protocolo de tinción

| <b>Etapas de la tinción</b>                 | <b>Tiempo</b>            |
|---|--------------------------|
| ▪ 3 lavados con agua destilada              | 5 min c/u                |
| ▪ Sumergir en solución de hematoxilina      | 2 min                    |
| ▪ 2 lavados de agua corriente               | 5 min c/u                |
| ▪ Sumergir en alcohol ácido 1% (v/v)*       | una vez de manera rápida |
| ▪ Sumergir en solución alcohólica de eosina | 20 s                     |
| ▪ 1 lavado de agua corriente                | 3 min                    |
| ▪ 3 lavados con agua destilada              | 5 min c/u                |

\* El alcohol ácido permitió eliminar el exceso de hematoxilina evitando que los núcleos de las células quedaran excesivamente teñidos.

**10) Deshidratación y aclaramiento:** Con las tinciones realizadas fue necesario eliminar el agua, con el fin de no interferir con el adhesivo final para el montaje. Por lo que se procedió a realizar las etapas 3 y 4 descritas inicialmente (**Tabla 8**).

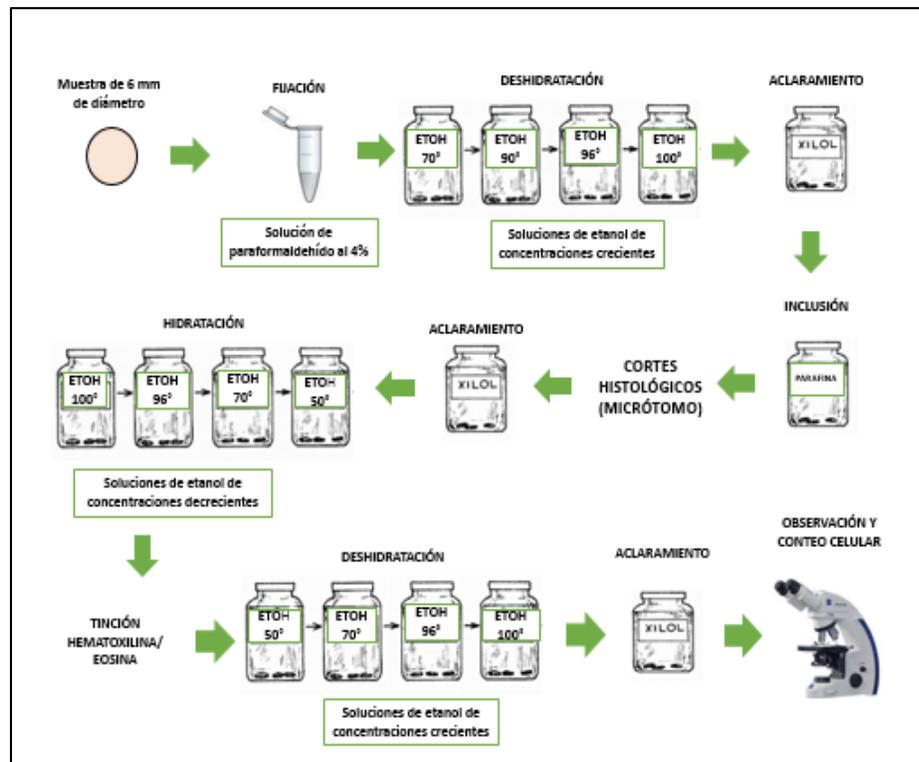
**Tabla 8.** Protocolo de deshidratación y aclaramiento

| <b>Deshidratación y aclaramiento</b>     | <b>Tiempo (min)</b> |
|--|---------------------|
| ▪ 2 lavados de ETOH 50 %                 | 3 c/u               |
| ▪ 1 lavado de ETOH 70%                   | 3                   |
| ▪ 1 lavado de ETOH 96%                   | 3                   |
| ▪ 1 lavado de ETOH 100% absoluto         | 3                   |
| ▪ 1 lavado de ETOH 100 % con xilol (1:3) | 5                   |
| ▪ 1 lavado de xilol                      | 5                   |
| ▪ 1 lavado de xilol                      | 5                   |

ETOH: etanol

**11) Montaje:** Con los cortes teñidos, deshidratados y aclarados se procedió a aplicar sobre las muestras gotas del medio de montaje Neo-Mount®. Sobre ellas se realizó un cierre hermético con una lámina de cubreobjetos, cuidando que no quedaran burbujas de aire. Una vez seco el medio y como este tiene un índice de refracción similar al vidrio se realizó la observación y conteo celular. El microscopio utilizado fue de la marca Zeiss modelo Primo Star con un aumento de observación de 100x.

La **Figura 7** resume el procedimiento histológico realizado.



**Figura 7.** Procedimiento histológico.

### c) **Conteo celular**

De los cortes obtenidos se seleccionaron tres representativos para cada dosis y animal, de cada corte se contaron 3 campos a un aumento de 100x. Obteniéndose 9 campos para cada uno de los animales controles (con TPA) y los tratados (TPA+ dosis mg/kg). A partir de las medianas de ambos se calculó el porcentaje de disminución del infiltrado celular.

$$\% \text{ DIC} = \frac{\text{M células C} - \text{M células T}}{\text{M células C}} \times 100$$

Donde,

M: mediana; DIC: disminución infiltrado celular; C: muestras controles y T: muestras tratadas.

Para el conteo celular se utilizaron dos criterios de inclusión: nitidez y morfología. A través de la observación de los núcleos de diferentes tipos de células inflamatorias. Imágenes de los leucocitos empleados en **Anexo 4**.

#### **4.4.2 Análisis estadístico**

Los resultados obtenidos se analizaron mediante la prueba estadística Wilcoxon para datos independientes, no paramétrico, el cual comparó la mediana de las muestras controles y tratadas.

## V. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 5.1 ESTUDIO QUÍMICO

#### 5.1.1 Rendimiento de los extractos de diez genotipos de *U. molinae*

Los rendimientos obtenidos para cada uno de los extractos de los distintos genotipos de *U. molinae* se presentan en la **Tabla 9**.

**Tabla 9.** Rendimiento de los extractos expresados en % p/p

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

EH: extracto de hexano. EDCM: extracto diclorometano. EAE: extracto acetato de etilo. EET: extracto etanólico. Los genotipos de hojas con superíndice F, indican los seleccionados por su calidad de frutos. Los cinco genotipos restantes fueron seleccionados por la cantidad de sus hojas.

Como se puede observar en la tabla anterior los EETs fueron los que presentaron más altos rendimientos. Éstos pueden relacionarse al CFT, estudios realizados anteriormente donde se cuantificó el contenido de estos compuestos en los EAEs y EETs se determinó que estos últimos tenían el mayor contenido. Cabe destacar que el EET del genotipo ZF-18, es aquel con más alto rendimiento y CFT (Peña-Cerda *et al.*, 2016).

### 5.1.2 Estudio cualitativo: Reacciones de identificación.

A continuación, en la **tabla 10** se presenta los resultados obtenidos para las reacciones de identificación de taninos, realizadas en los diez genotipos de *Ugni molinae* Turcz.

**Tabla 10.** Reacciones de identificación de taninos de los EETs de diez genotipos de *U. molinae*.

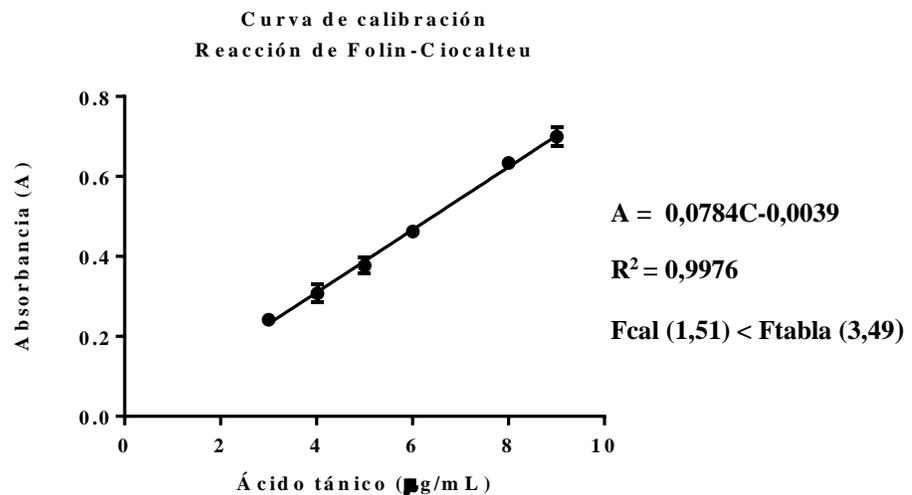
| Genotipo                     | Tricloruro férrico     | Reacción de Stiasny               | Formación de flobáfenos        |
|------------------------------|------------------------|-----------------------------------|--------------------------------|
| <b>EET ZF-18</b>             | (-) TC                 | (+) TC, pp rojo intenso           | (+) TC, coloración rojo oscuro |
|                              | (+) TG, pp azul oscuro | (+) TG, fil. azul oscuro-violáceo | -----                          |
| <b>EET 19-1</b>              | (-) TC                 | (+) TC, pp rojo claro             | (+) TC, coloración rojo oscuro |
|                              | (+) TG, pp azul oscuro | (+) TG, fil. azul oscuro-violáceo | -----                          |
| <b>EET 8-2</b>               | (-) TC                 | (+) TC, pp rojo-anaranjado        | (+) TC, coloración rojo oscuro |
|                              | (+) TG, pp azul oscuro | (+) TG, fil. azul oscuro-violáceo | -----                          |
| <b>EET 14-4</b>              | (-) TC                 | (+) TC, pp rojo-anaranjado        | (+) TC, coloración rojo oscuro |
|                              | (+) TG, pp azul oscuro | (+) TG, fil. azul oscuro-violáceo | -----                          |
| <b>EET 19-1<sup>ha</sup></b> | (-) TC                 | (+) TC, pp rojo-anaranjado        | (+) TC, coloración rojo oscuro |
|                              | (+) TG, pp azul oscuro | (+) TG, fil. azul oscuro-violáceo | -----                          |
| <b>EET 22-1<sup>F</sup></b>  | (-) TC                 | (+) TC, pp rojo claro             | (+) TC, coloración rojo oscuro |
|                              | (+) TG, pp azul oscuro | (+) TG, fil. azul oscuro-violáceo | -----                          |
| <b>EET 27-1<sup>F</sup></b>  | (-) TC                 | (+) TC, pp rojo claro             | (+) TC, coloración rojo oscuro |
|                              | (+) TG, pp azul oscuro | (+) TG, fil. azul oscuro-violáceo | -----                          |
| <b>EET 23-2<sup>F</sup></b>  | (-) TC                 | (+) TC, pp rojo-anaranjado        | (+) TC, coloración rojo oscuro |
|                              | (+) TG, pp azul oscuro | (+) TG, fil. azul oscuro-violáceo | -----                          |
| <b>EET 31-1<sup>F</sup></b>  | (-) TC                 | (+) TC, pp rojo-anaranjado        | (+) TC, coloración rojo oscuro |
|                              | (+) TG, pp azul oscuro | (+) TG, fil. azul oscuro-violáceo | -----                          |
| <b>EET 19-2<sup>F</sup></b>  | (-) TC                 | (+) TC, pp rojo-anaranjado        | (+) TC, coloración rojo oscuro |
|                              | (+) TG, pp azul oscuro | (+) TG, fil. azul oscuro-violáceo | -----                          |

EET: extracto etanólico. TG: taninos gálicos. TC: taninos catéquicos. (+) Reacción positiva. (-) Reacción negativa. pp: precipitado. fil.: filtrado. Los genotipos de hojas con superíndice F, indican los seleccionados por su calidad de frutos. Los cinco genotipos restantes fueron seleccionados por la cantidad de sus hojas.

En el **Anexo 5** se pueden observar las imágenes de las distintas reacciones de identificación para los diez genotipos de *U.molinae*.

### 5.1.3 Estudio cuantitativo : Contenido de taninos

A continuación se muestra la curva de calibración utilizada con el patrón de AT (**Figura 8**). Utilizada para el ensayo de R-FC.



**Figura 8.** Curva de calibración del patrón ácido tánico (AT). Concentraciones entre 3-9 µg/mL, a una longitud de onda de 700 nm. A: absorbancia. C: concentración.

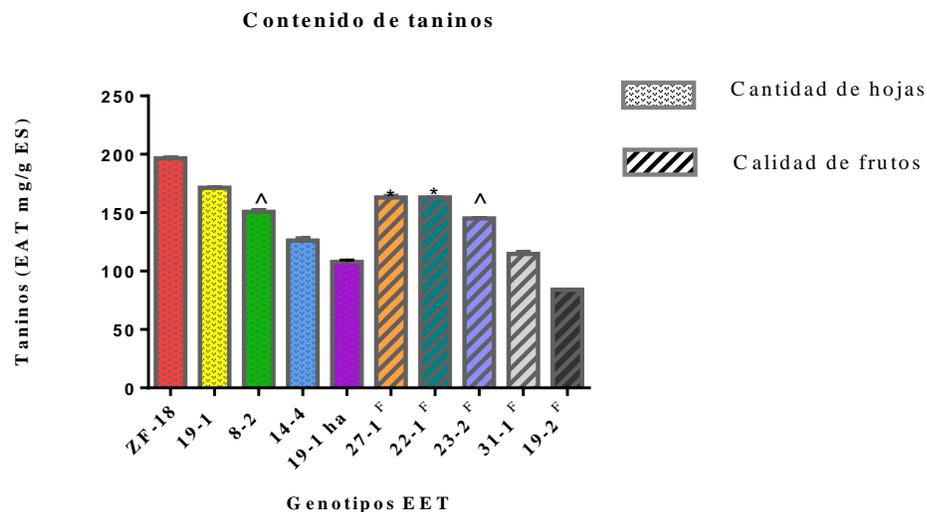
A partir de la interpolación en esta curva de las absorbancias obtenidas en el ensayo del reactivo de FC, se determinaron las concentraciones de los FT y FR. De la diferencia del CFT y CFR, se obtuvo el CT de los diez genotipos de los EETs de las hojas de murtilla.

Según el análisis estadístico ANOVA de una vía seguido del test de comparaciones múltiples de Tukey, con un  $p < 0,05$ , se demuestra que hay diferencias significativas entre los diez genotipos de *U.molinae*; con un rango de valores entre  $8,8 \pm 0,1$  y  $20,1 \pm 0,2$  % p/p. (**Tabla 11**).

**Tabla 11.** Contenido de fenoles totales, fenoles residuales y taninos de los diez genotipos de los EETs de las hojas de murtila. Expresados como mg equivalentes de ácido tánico por g de ES  $\pm$  DS.

| <b>Genotipo</b>              | <b>CFT<br/>EAT (mg/g ES)<br/><math>\pm</math> DS</b> | <b>CFR<br/>EAT (mg/g ES)<br/><math>\pm</math> DS</b> | <b>CT (CFT- CFR)<br/>EAT (mg/g ES)<br/><math>\pm</math> DS</b> | <b>% de Taninos</b>                          |
|------------------------------|--|--|--|--|
| <b>EET ZF-18</b>             | <b>263,9 <math>\pm</math> 2,8<sup>a</sup></b>        | <b>62,9 <math>\pm</math> 1,3<sup>a</sup></b>         | <b>201,0 <math>\pm</math> 1,6<sup>a</sup></b>                  | <b>20,1 <math>\pm</math> 0,2<sup>a</sup></b> |
| <b>EET 19-1</b>              | <b>225,3 <math>\pm</math> 1,3<sup>b</sup></b>        | <b>52,2 <math>\pm</math> 0,5<sup>b</sup></b>         | <b>173,1 <math>\pm</math> 0,9<sup>b</sup></b>                  | <b>17,3 <math>\pm</math> 0,1<sup>b</sup></b> |
| <b>EET 8-2</b>               | <b>229,8 <math>\pm</math> 3,9<sup>b</sup></b>        | <b>78,5 <math>\pm</math> 1,4<sup>c</sup></b>         | <b>151,2 <math>\pm</math> 2,6<sup>c</sup></b>                  | <b>15,1 <math>\pm</math> 0,3<sup>c</sup></b> |
| <b>EET 14-4</b>              | <b>200,1 <math>\pm</math> 3,6<sup>c</sup></b>        | <b>71,5 <math>\pm</math> 1,1<sup>d</sup></b>         | <b>128,6 <math>\pm</math> 2,8<sup>d</sup></b>                  | <b>12,9 <math>\pm</math> 0,3<sup>d</sup></b> |
| <b>EET 19-1<sup>ha</sup></b> | <b>166,7 <math>\pm</math> 2,2<sup>d</sup></b>        | <b>57,4 <math>\pm</math> 1,0<sup>e</sup></b>         | <b>109,4 <math>\pm</math> 1,2<sup>e</sup></b>                  | <b>10,9 <math>\pm</math> 0,1<sup>e</sup></b> |
| <b>EET 22-1<sup>F</sup></b>  | <b>231,9 <math>\pm</math> 2,4<sup>b*,e</sup></b>     | <b>66,1 <math>\pm</math> 0,4<sup>f</sup></b>         | <b>165,8 <math>\pm</math> 2,5<sup>f</sup></b>                  | <b>16,6 <math>\pm</math> 0,2<sup>f</sup></b> |
| <b>EET 27-1<sup>F</sup></b>  | <b>222,4 <math>\pm</math> 2,3<sup>b*,f</sup></b>     | <b>56,0 <math>\pm</math> 0,9<sup>e</sup></b>         | <b>166,4 <math>\pm</math> 1,4<sup>f</sup></b>                  | <b>16,6 <math>\pm</math> 0,1<sup>f</sup></b> |
| <b>EET 23-2<sup>F</sup></b>  | <b>211,1 <math>\pm</math> 0,4<sup>g</sup></b>        | <b>63,9 <math>\pm</math> 0,5<sup>a,f</sup></b>       | <b>147,2 <math>\pm</math> 0,2<sup>c</sup></b>                  | <b>14,7 <math>\pm</math> 0,0<sup>c</sup></b> |
| <b>EET 31-1<sup>F</sup></b>  | <b>187,5 <math>\pm</math> 3,8<sup>h</sup></b>        | <b>70,8 <math>\pm</math> 1,9<sup>d</sup></b>         | <b>116,7 <math>\pm</math> 2,4<sup>g</sup></b>                  | <b>11,7 <math>\pm</math> 0,2<sup>g</sup></b> |
| <b>EET 19-2<sup>F</sup></b>  | <b>162,6 <math>\pm</math> 1,0<sup>d</sup></b>        | <b>74,9 <math>\pm</math> 1,1<sup>g</sup></b>         | <b>87,7 <math>\pm</math> 0,6<sup>h</sup></b>                   | <b>8,8 <math>\pm</math> 0,1<sup>h</sup></b>  |

EET: extracto etanólico. CFT: contenido de fenoles totales. CFR: contenido de fenoles residuales. CT: contenido de taninos. EAT: equivalente de ácido tánico. Cada valor corresponde a un promedio de tres mediciones  $\pm$  DS (desviación estándar). Diferentes letras en cada columna indican que los valores son estadísticamente diferentes entre sí, con un  $p < 0,05$ , por análisis de varianza (ANOVA) de una vía seguido del test de comparaciones múltiple de Tukey. b\*: Si bien estos genotipos tienen misma letra, son significativos entre sí (letras diferentes e y f). Los genotipos con superíndice F, indican aquellos seleccionados por la calidad de sus frutos, mientras que los cinco genotipos restantes fueron seleccionados por la cantidad de sus hojas.



**Figura 9.** Contenido de taninos.

EET: extracto etanólico. EAT: equivalente de ácido tánico. Igual símbolo, genotipos con valores no significativos entre sí con  $p > 0,05$ . Según ANOVA de una vía seguido del test de comparaciones múltiples de Tukey. Contenido de taninos expresados en EAT (mg/g ES)  $\pm$  DS (Desviación estándar). Los genotipos de hojas con superíndice F, indican los seleccionados por su calidad de frutos. Los cinco genotipos restantes fueron seleccionados por la cantidad de sus hojas.

El genotipo con mayor CT fue el EET ZF-18 ( $201,0 \pm 1,6$  EAT mg/g ES), cantidad correspondiente a más del 70 % del CFT ( $263,9 \pm 2,8$  EAT mg/g ES). Mientras que el genotipo con menor CT corresponde al genotipo 19-2 ( $87,7 \pm 0,6$  EAT mg/g ES), siendo aproximadamente un 50% del CFT ( $162,6 \pm 1,0$  EAT mg/g ES). El genotipo ZF-18 supera en más de 3 veces en CT al genotipo 19-2.

Cabe destacar que el segundo genotipo con mayor CT corresponde al EET 19-1, el cual posee una variedad de sus frutos que se encuentra inscrita por el INIA, cuya denominación es “Read Pearl – INIA”. Dándole un valor agregado a sus hojas.

Según el test de comparaciones múltiples de Tukey el genotipo ZF-18 es comparativamente diferente a los otros nueve genotipos. Los genotipos 27-1 con 22-1 y 8-2 con 23-2 no presentan diferencias significativas entre sí. (En el **Anexo 6**, se muestran las diferencias entre los genotipos en detalle).

Respecto a la selección de los genotipos, se observa que los dos con mayor CT corresponden a los elegidos por su cantidad de hojas (ZF-18 y 19-1).

En relación a la técnica de precipitación utilizada en esta memoria, en donde los taninos de los extractos fueron separados con gelatina, se ha reportado que aquellos con alto peso molecular, precipitan mucho mejor que los con menor. Además de generarse una mejor precipitación en taninos que tengan presentes ésteres de ácido gálico entre sus subunidades (Olivas-Aguirre *et al.*, 2015). Por lo que podría relacionarse que dentro del CT de los genotipos debieran estar presentes compuestos de ésteres de ácido gálico y taninos de mayor tamaño. Peña-Cerda *et al.* (2016) indica la presencia de ácido gálico y sus derivados por lo que se verifica lo reportado.

También en esta misma investigación, en los cuales se determinó el CFT en los EETs, se obtuvo que los genotipos ZF-18 y 19-2 fueron los con mayor y menor cantidad respectivamente ( $260,6 \pm 3,7$  EAG mg /g ES y  $157,8 \pm 2,9$  EAG mg /g ES), siendo los mismos genotipos con mayor y menor CT, obtenidos en esta memoria.

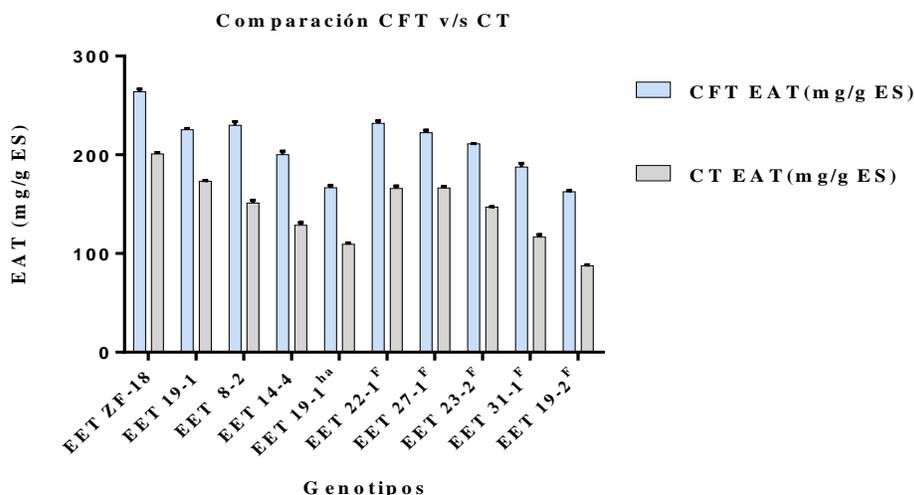
Si bien existen estudios de cuantificación del CT en murtilla, tales como Doll *et al.* (2012) y Avello *et al.* (2013), donde los resultados obtenidos fueron de 5,85 % p/p y 56,70 % p/p respectivamente, no es posible comparar los resultados de estas investigaciones con los obtenidos en esta memoria, ya que no existe una igualdad de condiciones del material vegetal ocupado, el cual se obtuvo de diferentes zonas y no tuvieron las mismas condiciones edafoclimáticas, en las publicaciones mencionadas. Se reporta que bajo la influencia de diferentes factores geoclimáticos como radiación, humedad y fertilidad de los suelos, la producción de los metabolitos secundarios estaría dada no sólo por la influencia del genotipo sino por otras características del ambiente donde estuvieron expuestos (Oh *et al.*, 2009).

Con los datos obtenidos previamente mediante el análisis estadístico y siendo los EETs de las hojas de los diez genotipos obtenidas bajo las mismas condiciones edafoclimáticas y manejo agronómico, se determina que existe una variación en relación al contenido de taninos dependiente del genotipo.

Finalmente la presente investigación es un aporte a los estudios realizados previamente en el laboratorio.

- COMPARACIÓN CT Y CFT

Al comparar los resultados obtenidos del CFT respecto al CT, a partir del coeficiente de correlación de Pearson (r). Se obtuvo que sí están correlacionados positivamente con un r cercano a 1 ( $r = 0,9688$ ) (**Figura 10**). Indicando que a mayor CT mayor es el CFT. El EET del genotipo ZF-18 destaca con el mayor CT y CFT. Además el coeficiente de determinación ( $R^2$ ) nos indica que el 93,9 % del CFT corresponden al CT.



**Figura 10.** Comparación CFT v/s CT.

CFT: Contenido de fenoles totales. CT: contenido de taninos. EAT: equivalente de ácido tánico. ES: extracto seco. EET: extracto etanólico de las hojas de *U. molinae*. Los genotipos con una F indican los elegidos por calidad de sus frutos, los restantes por cantidad de sus hojas.

- COMPARACIÓN CAPACIDAD ANTIOXIDANTE Y CT.

Investigaciones publicadas por Peña-Cerda *et al.* (2016) determinaron el efecto antioxidante de los EETs de los diez genotipos de *U. molinae*. En este estudio se identificó la presencia de variados compuestos fenólicos, a los cuales se les ha atribuido esta actividad. Dentro de éstos, se identificaron elagitaninos y derivados de ácido gálico,

los que según estudios han reportado tener efectos antioxidantes, tales como atrapar radicales libres, efectos sobre fotoprotección, inhibir peroxidación de lípidos, entre otros (Haslam, 1996; González *et al.*, 2001). Por esto, a continuación se compara el CT respecto a la capacidad antioxidante *in vitro* de los extractos.

**Tabla 12.** Comparación entre la actividad antioxidante *in vitro* de tres ensayos con el contenido de taninos de las hojas de *U.molinae* de los diez genotipos.

| Genotipo               | FRAP<br>(mmol Fe <sup>+2</sup> /g<br>ES) ± DS | DPPH<br>EA (10 <sup>-3</sup> )<br>± DS | ORAC-FL<br>μmol ET/mg ±<br>DS | CT<br>EAT (mg/g ES)<br>± DS |
|------------------------|---|--|-------------------------------|-----------------------------|
| EET ZF-18              | 5,4 ± 0,1 <sup>a</sup>                        | 1,43 ± 0,10 <sup>a</sup>               | 19,9 ± 1,5 <sup>a</sup>       | 201,0 ± 1,6 <sup>a</sup>    |
| EET 19-1               | 4,6 ± 0,1 <sup>b</sup>                        | 1,21 ± 0,01 <sup>a</sup>               | 23,8 ± 1,7 <sup>b</sup>       | 173,1 ± 0,9 <sup>b</sup>    |
| EET 8-2                | 4,5 ± 0,1 <sup>b</sup>                        | 1,49 ± 0,06 <sup>a</sup>               | 12,4 ± 0,9 <sup>c</sup>       | 151,2 ± 2,6 <sup>c</sup>    |
| EET 14-4               | 4,9 ± 0,3 <sup>b</sup>                        | 2,12 ± 0,03 <sup>b</sup>               | 20,1 ± 1,5 <sup>a</sup>       | 128,6 ± 2,8 <sup>d</sup>    |
| EET 19-1 <sup>ha</sup> | 3,8 ± 0,3 <sup>c</sup>                        | 1,05 ± 0,05 <sup>c</sup>               | 15,7 ± 1,1 <sup>c</sup>       | 109,4 ± 1,2 <sup>e</sup>    |
| EET 22-1 <sup>F</sup>  | 5,2 ± 0,2 <sup>a</sup>                        | 1,36 ± 0,03 <sup>a</sup>               | 21,1 ± 1,5 <sup>a</sup>       | 165,8 ± 2,5 <sup>f</sup>    |
| EET 27-1 <sup>F</sup>  | 4,9 ± 0,1 <sup>b</sup>                        | 1,33 ± 0,03 <sup>a</sup>               | 14,6 ± 1,1 <sup>c</sup>       | 166,4 ± 1,4 <sup>f</sup>    |
| EET 23-2 <sup>F</sup>  | 4,5 ± 0,1 <sup>b</sup>                        | 1,44 ± 0,05 <sup>a</sup>               | 8,6 ± 0,6 <sup>d</sup>        | 147,2 ± 0,2 <sup>c</sup>    |
| EET 31-1 <sup>F</sup>  | 4,6 ± 0,0 <sup>b</sup>                        | 1,48 ± 0,04 <sup>a</sup>               | 16,7 ± 1,2 <sup>c</sup>       | 116,7 ± 2,4 <sup>g</sup>    |
| EET 19-2 <sup>F</sup>  | 4,0 ± 0,3 <sup>c</sup>                        | 1,40 ± 0,08 <sup>a</sup>               | 20,4 ± 1,5 <sup>a</sup>       | 87,7 ± 0,6 <sup>h</sup>     |

EET: extracto etanólico. FRAP: Poder antioxidante reductor de hierro. DPPH: método del radical 2,2-difenil-1-picrilhidrazilo. ORAC-FL: Ensayo de capacidad de absorbanza del radical oxígeno-fluoresceína. CT: contenido de taninos. EA: eficiencia antioxidante. EAT: equivalente de ácido tánico. ET: equivalente de Trolox. Cada valor corresponde a un promedio de tres mediciones ± DS (desviación estándar). Diferentes letras en cada columna indican que los valores son estadísticamente diferentes entre sí, con un  $p < 0,05$ , por análisis de varianza (ANOVA) de una vía seguido del test de comparaciones múltiples de Tukey. Con celeste oscuro genotipos con mayor efecto y con verde claro con menor. Los genotipos con superíndice F, son seleccionados por la calidad de sus frutos, mientras que los genotipos restantes fueron seleccionados por la cantidad de sus hojas. Los datos de estos tres ensayos de actividad antioxidante fueron obtenidos de investigaciones publicadas por Peña-Cerda *et al.* (2016).

Como podemos observar de la **Tabla 12** al comparar el CT versus los ensayos de actividad antioxidante, los resultados obtenidos fueron:

FRAP: Al igual que en el CT destaca el genotipo ZF-18, quien obtuvo la mayor capacidad reductora, mientras que el con menor fue 19-1<sup>ha</sup> siendo diferente respecto a los taninos cuyo menor fue el genotipo 19-2. Al correlacionar el CT y el valor FRAP se observa una correlación lineal con un  $r$  de 0,8129. El coeficiente de determinación ( $R^2$ ) fue de un 66,1 %, por lo que existe una influencia por parte del CT.

DPPH: En este ensayo con mayor eficiencia antioxidante (EA) lo obtuvo el genotipo 14-4 y con el menor el 19-1<sup>ha</sup>, siendo diferente en comparación con el CT. Al correlacionar los datos del CT respecto al EA nos da un  $r = -0,0806$ , lejano a 1, indicando que no existe relación. Por lo que los taninos no están influenciando en la capacidad antioxidante de este ensayo.

ORAC-FL: En este ensayo el genotipo destacado fue el 19-1, el cual al comparar con respecto al CT, fue el segundo con mayor cantidad. Mientras que el genotipo con menor fue el 23-2 siendo diferente al CT. Al correlacionar los dos parámetros nos da un  $r = 0,0688$ , lejano a 1 indicando que no existe relación. Nuevamente el CT no está influenciando en la capacidad antioxidante.

En los tres ensayos donde se evaluó la actividad antioxidante solo en uno se observó una relación con respecto al CT de los diez genotipos de los EETs. Esto podría relacionarse a que tanto el ensayo de FC para determinar el CT, como el ensayo del poder antioxidante reductor de hierro (FRAP), sus fundamentos de reacción son en base a transferencia de electrones (Huang *et al.*, 2005).

Cabe mencionar que destacaron dos genotipos con el mayor CT (ZF-18 y 19-1). Por lo que los taninos de estos genotipos podrían estar influyendo en esta actividad antioxidante.

No podemos dejar de mencionar que los extractos se encuentran compuestos no sólo por taninos, sino también por flavonoides y ácidos fenólicos, entre otros, que

también se encuentran influyendo en el efecto final de la capacidad antioxidante. Entre estos flavonoides, la quercetina reporta ser uno de los mejores antioxidantes por poseer presencia de estructura O-dihidroxi en el anillo B, confiriéndole mayor estabilidad a la forma radical y participar en la deslocalización de los electrones; doble enlace en conjugación con la función 4-oxo del anillo C y la presencia de grupos OH en posición 3 y 5 con función 4-oxo en los anillos A y C, necesarios para ejercer el máximo poder antioxidante (Martínez-Florez *et al.*, 2002).

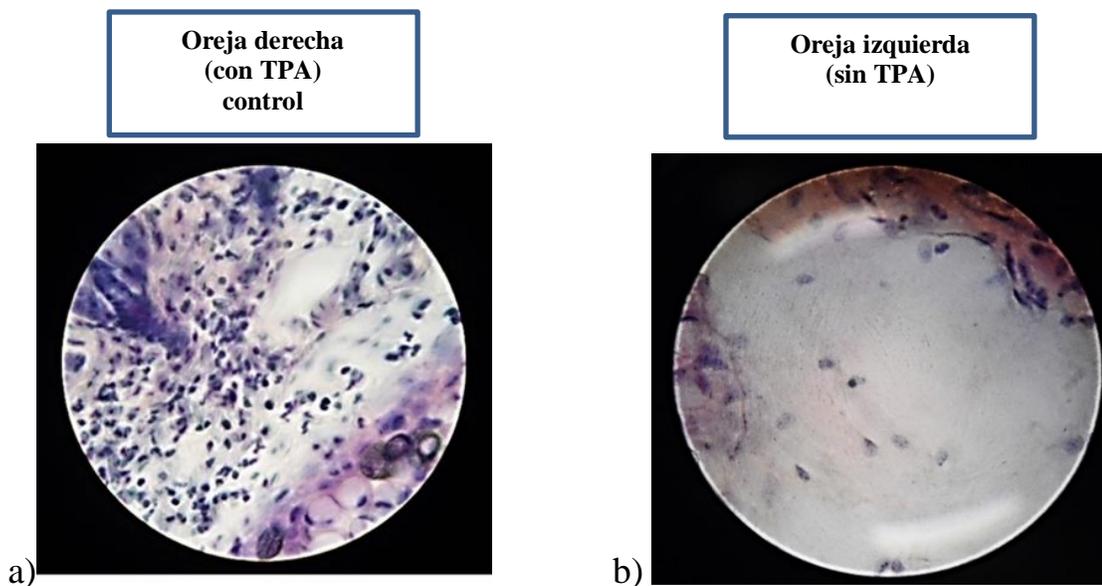
Finalmente la capacidad antioxidante de una mezcla, en este caso los extractos, no está determinada solo por la suma de las capacidades de cada uno de los compuestos que lo formen, sino también depende del microambiente donde se encuentre cada compuesto. Interactuando entre sí, produciéndose efectos sinérgicos o inhibitorios. (Robards *et al.*, 1999). Por lo que si un compuesto se encuentra en grandes concentraciones, no necesariamente es aquel que está realizando el efecto, sino que puede estar influenciando o interfiriendo en el resultado final.

## **5.2 ESTUDIO FARMACOLÓGICO**

### **5.2.1 Efecto de disminución del infiltrado celular inducido por TPA.**

Como se indicó anteriormente en esta etapa del estudio se evaluó la disminución sobre la infiltración celular.

El propósito de este estudio fue determinar si los extractos a diferentes dosis producían una disminución en la cantidad de células que llegaban a la zona inflamada. A continuación podemos apreciar el infiltrado celular en la oreja derecha, cuya inflamación fue inducida con TPA (control) y en la oreja izquierda, en la cual no se indujo inflamación, solo se aplicó vehículo acetona. Se observa una mayor cantidad celular en la oreja derecha en comparación a la oreja izquierda (**Figura 11**).



**Figura 11.** a) Infiltrado celular en la oreja derecha control, inflamación inducida por TPA y (b) ausencia de infiltrado en oreja izquierda a la cual no se le indujo inflamación.

TPA: 12-O-tetradecanoilforbol-13-acetato.

Para los dos extractos evaluados los %DIC fueron:

❖ **EAE 19-1**

**Tabla 13.** Dosis-respuesta del porcentaje de disminución del infiltrado celular del EAE 19-1.

| Dosis     | % DIC $\pm$ SEM              |
|-----------|------------------------------|
| 50 mg/kg  | Sin efecto                   |
| 100 mg/kg | 35,5 <sup>*a</sup> $\pm$ 5,6 |
| 150 mg/kg | 27,4 <sup>*a</sup> $\pm$ 4,6 |

Con (\*)  $p \leq 0,05$  análisis estadístico con Wilcoxon. Igual letra no significativamente diferente. DIC: disminución del infiltrado celular. SEM: error estándar de la media.

En la **Tabla 13** se observó una disminución del infiltrado celular considerado significativo en dosis de 100 mg/kg y 150 mg/kg. Presentando la primera el mayor efecto con un 35,5%. No existiendo diferencias significativas entre las dosis.

En el caso de la dosis de 50 mg/ kg el EAE no fue capaz de generar un efecto de disminución.

Uno esperaría que a medida que se fue aumentando la dosis el efecto también hubiera ido creciendo, pero esto no ocurrió quizás porque el efecto máximo ya había sido alcanzado.

Al comparar el efecto antiinflamatorio (EA) *in vivo*, obtenido en un estudio previo (**Tabla 14**), no hay una relación con el efecto de disminución del infiltrado celular, ya que el EA máximo alcanzado fue a las dosis de 150 mg/kg con un 36,6 % siendo diferente al % DIC.

**Tabla 14.** Dosis-respuesta del efecto antiinflamatorio por vía oral del EAE 19-1 en el modelo de inflamación inducida por TPA.

| <b>Dosis</b>     | <b>TPA<br/>%EA ± SEM</b> |
|------------------|--------------------------|
| <b>50 mg/kg</b>  | <b>11,9* ± 1,7</b>       |
| <b>100 mg/kg</b> | <b>22,5 * ± 5,9</b>      |
| <b>150 mg/kg</b> | <b>↑36,6* ± 5,9</b>      |
| <b>200 mg/kg</b> | <b>22,0 * ± 2,9</b>      |

\* $p \leq 0,05$ ; EA: efecto antiinflamatorio. ↑máximo efecto. TPA: 12-O-tetradecanoilforbol-13-acetato. Estadística de Wilcoxon. SEM: error estándar de la media.

❖ **EET 31-1**

**Tabla 15.** Dosis-respuesta del porcentaje de disminución del infiltrado celular del EET 31-1.

| <b>Dosis</b>     | <b>% DIC <math>\pm</math> SEM</b>             |
|------------------|---|
| <b>50 mg/kg</b>  | <b>Sin efecto</b>                             |
| <b>100 mg/kg</b> | <b>38,7*<sup>a</sup> <math>\pm</math> 4,4</b> |
| <b>300 mg/kg</b> | <b>35,5*<sup>a</sup> <math>\pm</math> 5,3</b> |

\* $p \leq 0,05$  análisis estadístico con Wilcoxon. Igual letra no significativamente diferente. DIC: disminución del infiltrado celular. SEM: error estándar de la media.

En la **Tabla 15**. Se observó una disminución del infiltrado celular significativo en dosis de 100 mg/kg y 300 mg/kg, siendo el efecto mayor en la primera con un 38,7 %. Al igual que el extracto anterior no hubo diferencias significativas entre dosis. A dosis de 50 mg/kg el extracto no generó disminución celular.

Al comparar los resultados con el EA *in vivo* (**Tabla 16**) vemos una relación, ya que a dosis superior de 200 mg/ kg que corresponde al efecto máximo con 35,5 %, el efecto es menor. Observándose lo mismo con el porcentaje DIC, la cual a dosis de 300 mg/kg el efecto es menor que a 100 mg/kg donde se alcanzó el mejor efecto. Esto podría asociarse a que el efecto máximo ya había sido alcanzado.

**Tabla 16.** Dosis-respuesta del efecto antiinflamatorio por vía oral del EET 31-1 en el modelo de inflamación inducida por TPA.

| <b>Dosis</b>     | <b>TPA<br/>%EA ± SEM</b> |
|------------------|--------------------------|
| <b>50 mg/kg</b>  | <b>8,8 ± 6,9</b>         |
| <b>100 mg/kg</b> | <b>19,9* ± 7,3</b>       |
| <b>200 mg/kg</b> | <b>↑35,5* ± 6,0</b>      |
| <b>300 mg/kg</b> | <b>34,0* ± 6,0</b>       |

\* $p \leq 0,05$ ; EA: efecto antiinflamatorio. ↑máximo efecto. TPA: 12-O-tetradecanoilforbol-13-acetato. Estadística de Wilcoxon. SEM: error estándar de la media.

Podemos destacar que en ambos extractos se produce el mayor %DIC a 100 mg/kg, siendo 35,5% para el EAE 19-1 y 38,7 % para el EET 31-1.

Estudios en nuestros laboratorios determinaron el contenido de ácidos triterpénicos y polifenoles totales en los diez genotipos de EAEs y EETs (Arancibia-Radich *et al.*, 2016; Peña-Cerda *et al.*, 2016). Obteniéndose mayor contenido de ácidos triterpénicos en los EAEs y tres veces más CFT en los EETs. Por lo que podríamos asociar el efecto obtenido sobre el %DIC, a la presencia de diferentes metabolitos presentes en los extractos.

Si bien ninguno de los dos extractos de los genotipos estudiados en esta memoria (19-1 y 31-1), se destacaron respecto al contenido de CFT y triterpenos, esto podría estar relacionado a que no siempre el genotipo con mayor cantidad de compuestos es aquel más activo, las interacciones entre compuestos generan sinergismo o antagonismo que pueden afectar la actividad final. Esto se ve corroborado, en un estudio comparativo realizado en nuestro laboratorio y publicado recientemente, donde se determinó el efecto antiinflamatorio de los EAEs y EETs *in vivo*, por inducción de la inflamación con TPA, a dosis única oral de 200 mg/kg (Arancibia-Radich *et al.*, 2016). El EAE 19-1 no

destacó, pero si lo hizo el EET 31-1 siendo el mejor de los EETs con un EA de 35,5%. Lo que podría estar relacionado con la composición química presente en el extracto de este genotipo. El motivo de mencionar este ensayo es que estos metabolitos secundarios presentes, además de estar influyendo en la disminución del edema de la oreja inducida por TPA, también podrían estar haciéndolo sobre la disminución del infiltrado celular, procesos que ocurren durante la inflamación. Es por esto que al observar también una disminución significativa sobre el número de células, siendo también mejor en el EET 31-1, se podría relacionar este efecto alcanzado, a la presencia de compuestos fenólicos, como los taninos, cuyo efecto antiinflamatorio han sido reportados (Mota *et al.*, 1985; Souza *et al.*, 2007).

Otra arista posible de relacionar, es que la disminución de infiltración celular podría deberse a la capacidad antioxidante que han presentado los extractos en estudios publicados (Peña-Cerda *et al.*, 2016), propiedad atribuida a la presencia de compuestos fenólicos, entre ellos los taninos. Estos metabolitos se encargan de atrapar radicales libres y quelar metales, reduciendo así el estrés oxidativo. Dentro de las fuentes endógenas de especies reactivas de oxígeno (EROS) están las células defensivas, tales como polimorfonucleares, monocitos sensibilizados, macrófagos y eosinófilos, las cuales tienen diversas proteínas como vías metabólicas que generan especies agresivas como peróxido de hidrógeno, radicales superóxido e hidroxilo, que lesionan y eliminan elementos extraños. En equilibrio estas especies no deberían afectar las células, pero en un estado oxidativo si las dañarían (Avello y Suwalsky, 2006). Esto se relaciona directamente con la inflamación, ya que el estrés oxidativo desencadena la activación del factor nuclear kappa B (NF- $\kappa$ B), quien tiene un rol potencial en enfermedades inflamatorias como artritis reumatoidea y asma, debido a que actúa como inductor de variados blancos, tales como citoquinas proinflamatorias, quimiocinas, enzimas promotoras de inflamación, inmunoreceptores y moléculas de adhesión, las cuales generan acumulación de leucocitos en los tejidos (Meager, 1999; Fan *et al.*, 2002). Por lo que disminuyendo el estrés oxidativo se estaría influyendo sobre la inflamación y el infiltrado celular.

Entre los compuestos presentes en los EETs (Peña-Cerda *et al.*, 2016), se ha detectado la presencia de variados fenoles, entre los que se encuentran ácidos gálico y elágico y sus derivados. Siendo estos compuestos reportados con efectos sobre el proceso inflamatorio, por sus propiedades antioxidantes y antiinflamatorias. Investigaciones en granada demostraron que tanto el zumo como el extracto de ésta, inhiben el factor nuclear NF- $\kappa$ B y la viabilidad celular en células de cáncer de próstata *in vitro*. Dentro de los metabolitos presentes en la granada se encontró la presencia de taninos hidrolizables como los elagitaninos, punicalaginos y galotaninos (Rettig *et al.*, 2008).

Galatos (ésteres de ácido gálico) inhiben la translocación del factor NF- $\kappa$ B y la expresión de genes que codifican para VCAM-1, ICAM-1 (moléculas de adhesión 1 celular vascular e intercelular, respectivamente) y selectina E. Moléculas que permiten la adhesión y salida de los leucocitos desde los vasos sanguíneos hacia la zona de inflamación (Murase *et al.*, 1999).

Estudios en granada, compuesta en su mayoría por elagitaninos mostró inhibición en el edema, hiperplasia y expresión de ciclooxigenasa 2 (COX-2) al aplicar previamente a nivel local diferentes dosis de una fracción rica en taninos. Procesos inducidos por aplicación previa de TPA (Afaq *et al.*, 2005).

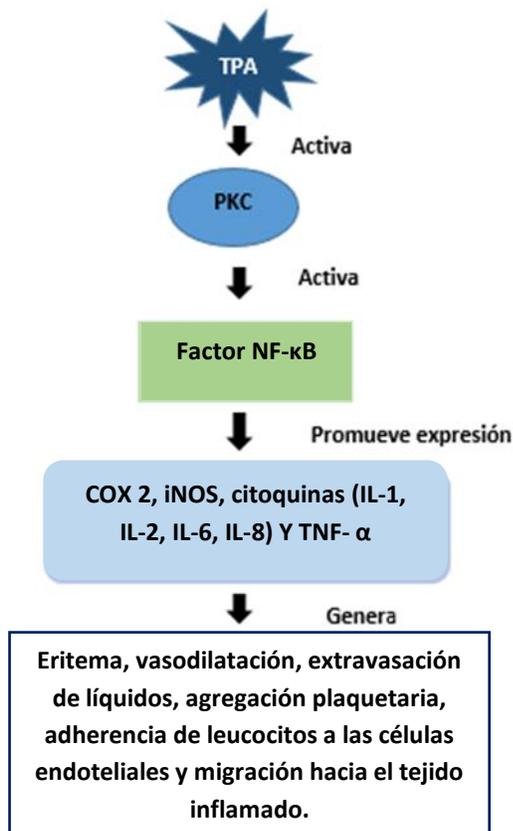
Estudios realizados en *Rhizophora mangle* L., comprobó su efecto antioxidante en extractos acuosos y su fracción fenólica. A partir de la inhibición de la producción de anión superóxido en macrófagos activados con lipopolisacáridos (LPS) y TPA. Se cuantificó el contenido de taninos y se relacionó con este efecto. En este caso en ambos extractos hubo una disminución significativa de la producción del radical inducidas por ambos agentes estando directamente relacionada con el contenido de taninos (Calero *et al.*, 2012).

Otros compuestos fenólicos presentes en los EETs, también han reportado efectos sobre la inflamación. La quercetina ha demostrado que inhibe la vía del factor NF- $\kappa$ B y la expresión de citoquinas proinflamatorias expresados en macrófagos con LPS (Cho *et al.*, 2003). Además de regular la expresión de ICAM-1 en células endoteliales humanas,

mediante la inhibición de proteína kinasa c-JUN (JNK) (Kobuchi *et al.*, 1999). También el éster de ácido cafeico inhibe producción de óxido nítrico y 5- lipooxigenasa (Sudina *et al.*, 1993).

En el caso de los ácidos triterpénicos presentes en los EAEs y EETs. Se han reportado que estos influyen en la liberación de citoquinas proinflamatorias, tal como el ácido maslínico que suprime el efecto de liberación del óxido nítrico y liberación de IL-6 y factor de necrosis tumoral (TNF- $\alpha$ ) (Márquez *et al.*, 2006).

Finalmente la evaluación de la disminución de la infiltración celular ratifica el uso del TPA como agente inductor de la inflamación, ya que produjo llegada de leucocitos a la zona de inflamación, observado en las fotografías en **Anexo 7**. Según Ban *et al.* (2009), la administración tópica del TPA provoca un edema agudo con infiltración de leucocitos. Este agente genera la activación de la proteína PKC, la cual es dependiente de calcio y fosfolípidos. Esta kinasa procede a la activación del factor NF- $\kappa$ B, quien viaja desde el citoplasma al núcleo y expresa variados agentes proinflamatorios tales como COX-2, iNOS, citoquinas inflamatorias (IL-1, IL-2, IL-6, IL-8) y TNF- $\alpha$  (**Figura 12**).



**Figura 12.** Mecanismo de acción del TPA.

TPA: 12-O-tetradecanoilforbol-13-acetato. NF-κB: factor nuclear kappa B. PKC: proteína quinasa C. COX 2: ciclooxigenasa 2. iNOS: óxido nítrico sintasa inducible. IL: interleuquina. TNF- α: factor de necrosis tumoral.

Inhibiendo etapas de este proceso se podría asociar la forma en que los compuestos fenólicos, como los taninos, podrían estar actuando sobre la infiltración celular y ejerciendo efectos antiinflamatorios.

Por lo anterior reportado podríamos relacionar que los compuestos fenólicos, como los taninos quienes poseen efectos antioxidantes y antiinflamatorios pueden estar influenciando la disminución de las células que infiltran en la zona de inflamación. Sin embargo, no podemos dejar de mencionar que los extractos se encuentran formados por variados otros compuestos como triterpenos, flavonoides, los cuales también pueden estar influyendo en el efecto final observado en este estudio.

No existen estudios en murtila donde se haya determinado el número de células en la zona inflamada por lo que es un aporte para investigaciones futuras.

## VI. CONCLUSIONES

- a) Se confirman ambas hipótesis, ya que se determinó diferencia en el contenido de taninos entre los extractos etanólicos de las hojas de los diez genotipos de *U. molinae*, siendo esta variación atribuida al genotipo, puesto que todos fueron cultivados bajo las mismas condiciones edafoclimáticas y de manejo agronómico.  
Asimismo la actividad antiinflamatoria de los extractos se asoció a una disminución significativa del infiltrado celular.
- b) Los diez genotipos presentan diferencias significativas entre sí, respecto al contenido de taninos. Siendo el genotipo ZF-18, el con mayor cantidad total de éstos.
- c) Respecto a los genotipos seleccionados por presentar una cantidad de hojas, fueron los con mayor contenido de taninos (genotipos ZF-18 y 19-1).
- d) Los extractos de los genotipos 19-1 y 31-1, disminuyeron la infiltración celular en las dosis más altas evaluadas.
- e) El EET del genotipo 31-1, exhibió el más alto porcentaje de disminución del infiltrado celular. En estudios previos, este genotipo presentó el mayor efecto antiinflamatorio en el modelo de edema en oreja de ratón, por lo que es un candidato para continuar estudios futuros, relacionados al proceso inflamatorio.
- f) Existe relación lineal entre el efecto antioxidante y el contenido de taninos, observado en el método FRAP (ensayo del poder antioxidante reductor de hierro).

## VII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

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

AGUIRRE M. Aislamiento e identificación de los principios activos antiinflamatorios y antioxidantes de las hojas de *Ugni molinae* Turcz (murtilla) myrtaceae. Obtención de un extracto estandarizado. Tesis para optar al grado de doctor en ciencias farmacéuticas. Santiago, Chile. Universidad de Chile, Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas, 2007. 26-27 pp.

AFAQ F., Saleem M., Krueger C. G., Reed J.D., Mukhtar H. Anthocyanin- and Hydrolyzable Tannin-Rich Pomegranate Fruit Extract Modulates MAPK and NF-kB Pathways and Inhibits Skin Tumorigenesis in CD-1 Mice. Int. J. Cancer, 113: 423–433, 2005.

ARANCIBIA-RADICH J., Peña-Cerda M., Jara D., Goity L., Valenzuela-Barra G., Silva X., Garrido G., Delporte C., Seguel I. 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, 2016.

AVELLO M., Pastene E. Actividad antioxidante de infusos de *Ugni molinae* Turcz (“murtilla”). Boletín Latinoamericano y del Caribe de Plantas Medicinales y Aromáticas, 4(2): 33-39, 2005.

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

AVELLO M., Valdivia R., Mondaca M., Ordoñez J., Bittner M., Becerra J. Actividad de *Ugni molinae* Turcz. frente a microorganismos de importancia clínica. Boletín Latinoamericano y del Caribe de Plantas Medicinales y Aromáticas, 8(2): 141-144, 2009.

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

AVELLO M., Pastene E., Bustos E., Barriga A., Bittner M., Ruiz E., Becerra J. Chemical properties and assessment of the antioxidant capacity of leaf extracts from populations of *Ugni molinae* growing in Continental Chile and in Juan Fernandez Archipelago. Journal of Pharmacognosy and Phytochemical Research, 6(4): 746-752, 2014.

BAN J., Oh J.H., Kim D.J., Jeong H-S., Han S.B., Hong J.T. Antiinflammatory and arthriticeffects of thiacremonone, a novel sulfur compound isolated from garlic via inhibition of NF- $\kappa$ B. Arthritis Research & Therapy, 11(5): 1-13, 2009.

CALERO J., García R., Mitjavila M.T. Efecto de *Rhizophora mangle* L. sobre la producción de anión superóxido en macrófagos murinos RAW 264.7. Revista Cubana de Plantas Medicinales, 17(3): 223-232, 2012.

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

CHO S.Y., Park S.J., Kwon M.J., Jeong T.S., Bok S.H., Choi W.Y., Jeong W.I., Ryu S.Y., Do S.H., Lee C.S., Song J.C., Jeong K.S. Quercetin suppresses proinflammatory cytokines production through MAP kinases and NF-Kappa B pathway in lipopolysaccharide-stimulated macrophage. Mol Cell Biochem, 243: 153-60, 2003.

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

DOLL U., Rodríguez I., Soto C., Razmilic I. 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, 2012.

FAN H., Sun B., Gu Q., Lafond-Walker A., Cao S., Becker L.C. Oxygen radicals trigger activation of NF-kappa B and AP-1 and upregulation of ICAM-1 in reperfused canine heart. Am J Physiol Heart Circ Physiol, 282 (5): 778 – 86, 2002.

GOITY L. E., Queupil M. J., Jara D., Alegría S. E., Peña M., Barriga A., Aguirre M. C., Delporte C. An HPLC-UV and HPLC-ESI-MS based method for identification of anti-inflammatory triterpenoids from the extracts of *Ugni molinae*. Boletín Latinoamericano y del Caribe de Plantas Medicinales y Aromáticas 12(1): 108 – 116, 2013.

GONZÁLEZ Y., Peña-Sánchez M., Sánchez-Álvarez R., Santa J.L. Taninos de diferentes especies vegetales en la prevención del fotoenvejecimiento. Revista Cubana Investigaciones Biomédicas, 20(1): 16-120, 2001.

HASLAM, E. Natural polyphenols (vegetable tannins) as drug: possible modes of action. Journal of Natural Products, 59(2): 205-215, 1996.

HOFFMANN J.A. Flora Silvestre de Chile Zona Araucana. 2ª ed. Santiago, Editorial Claudio Gay, 1991. 160p.

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

KOBUCHI H., Roy S., Sen CK., Nguyen H.G., Packer L. Quercetin inhibits inducible ICAM-1 expression in human endothelial cells through the JNK pathway. Am J Physiol 277: C403-11, 1999.

KUMAR V., Abbas A.K., Fausto N., Mitchell R.N. Robbins Patología humana. 8ª ed. Barcelona, Elsevier Saunders, 2008. 34-54p.

KY L., Le Flonch A., Zeng L., Pechamat L., Jourdes M., Teissedre P-L. Tannins. Encyclopedia of Food and Health, 247-255, 2016.

LASTRA H., Rodríguez E., Ponce de León H., González M. Método analítico para la cuantificación de taninos en el extracto acuoso de romerillo. Revista Cubana de Plantas Medicinales, 5(1): 17-22, 2000.

MÁRQUEZ A., De La Puerta R., Fernández-Arche A., Ruiz-Gutiérrez V. Suppressive effect of maslinic acid from pomace olive oil on oxidative stress and cytokine production in stimulated murine macrophages. Free Radical Res, 40: 295 – 302, 2006.

MARTÍNEZ-FLOREZ S., González-Gallego J., Culebras J.M., Tuñón M. J. Los flavonoides: propiedades y acciones antioxidantes. Nutrición Hospitalaria, 17 (6): 271-278, 2002.

MEAGER A. Cytokine regulation of cellular adhesion molecule expression in inflammation. Cytokine Growth Factor Reviews, 10(1): 27-39, 1999.

MONTENEGRO G. Chile nuestra flora útil: Guía de plantas de uso apícola, en medicina folclórica, artesanal y Ornamental, Universidad Católica de Chile. Santiago, Chile. 2002. 241–242p.

MOTA M.L.R., Thomas G., Barbosa Filho J.M. Anti-inflammatory actions of tannins isolated from the bark of *anacardium occidentale* L. Journal of Ethnopharmacology, 13: 289-300, 1985.

MUÑOZ M., Barrera E., Meza I. In El uso medicinal y alimenticio de plantas nativas y naturalizadas en Chile. Museo de Historia Natural. Santiago, Chile. 1981. Publicación ocasional N°33. 52–53p.

MURASE T., Kume N., Hase T., Shibuya Y., Nishizawa Y., Tokimitsu I., Kita T. Gallates inhibit cytokine-induced nuclear translocation of NF-KB and expression of Leukocyte adhesion molecules in vascular endothelial cells. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 19(6): 1412-20, 1999.

OH M., Trick H., Rajashekar C. Secondary metabolism and antioxidants are involved in environmental adaptation and stress tolerance in lettuce. Journal of Plant Physiology, 166: 180-91, 2009.

OKUDA T., Yoshida T., Hatano T. Oligomeric hydrolysable tannins, a new class of plant polyphenols Heterocycles, 30: 1195–1218, 1990.

OLIVAS-AGUIRRE J. F., Wall-Medrano A., González-Aguilar G. A., López- Díaz J. A., Álvarez-Parrilla E., de la Rosa L. A., Ramos-Jimenez A. Revisión: Taninos hidrolizables; bioquímica, aspectos nutricionales y analíticos y efectos en la salud. Nutrición Hospitalaria, 31(1): 55-66, 2015.

PEÑA-CERDA M., Arancibia-Radich J., Valenzuela-Bustamante P., Pérez-Arancibia R., Barriga A., Seguel I., Garcia L., Delporte C. Phenolic composition and antioxidant capacity of *Ugni molinae* Turcz. leaves of different genotypes. Food Chemistry, 215: 219-227, 2016.

RAMÍREZ C., Romero M., Henríquez O. Estudios de germinación en semillas de Mirtáceas Chilenas. BOSQUE, 3(2): 106-114, 1980.

RETTIG M.B., Heber D., An J., Seeram N.P., Rao J.Y., Liu H., Klatter T., Beldegrun A., Moro A., Henning S.M., Mo D., Aronson W.J., Pantuck A. Pomegranate extract inhibits androgen-independent prostate cancer growth through a nuclear factor-KB-dependent mechanism. Molecular Cancer Therapeutics, 7(9): 2662–2671, 2008.

ROBARDS K., Prenzler P.D., Tucker G., Swatsitang P., Glover W. Phenolic compounds and their role in oxidative processes in fruits. Food Chemistry, 66(4): 401-406, 1999.

ROSS Michael. H. y Wojciech Pawlina. Histología: Texto y Atlas color con Biología Celular. 5a ed. Buenos Aires, Editorial médica panamericana, 2007. 3-7p.

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

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

SCALBERT A. Antimicrobial properties of tannins. Phytochemistry, 30: 3875–3883, 1991.

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

SERRANO J., Puuppoen-Pimia R., Dauer A., Aura A.M., Saura F. Review Tannins: Current knowledge of food sources, intake, bioavailability and biological effects. Journal of Molecular Nutrition and Food Research, 53: S310 – S329, 2009.

SOUZA S. M. C., Aquino L. C. M., Milach Jr A. C., Bandeira M. A. M., Nobre M. E. P., Viana G. S. B. Antiinflammatory and Antiulcer Properties of Tannins from *Myracrodruon urundeuva* Allemão (Anacardiaceae) in Rodents. Journal of Phytotherapy Research, 21: 220–225, 2007.

SUD´TINA G. F., Mirzoeva O.K., Pushkareva M.A., Korshunova G.A., Symbatyan N.V., Varfolomeev S.D. Caffeic acid phenethyl ester as a lipoxygenase inhibitor with antioxidant properties. FEBS letters, 329(1-2): 21-24,1993.

SUWALSKY M., Orellana P., Avello, M y Villena, F. Protective effect of *Ugni molinae* Turcz against oxidative damage of human erythrocytes. Food Chem Toxicology, 45: 130–135, 2007.

VALENZUELA-BUSTAMANTE P. Evaluación de la actividad antioxidante y determinación del contenido de fenoles totales y flavonoides de hojas de diferentes genotipos de *Ugni molinae* turcz. Memoria para optar al título de Químico Farmacéutico. Santiago, Chile. Universidad de Chile, Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas, 2015. 14, 29 y 36 p.

VESTWEBER D. How leukocytes cross the vascular endothelium. Nature Reviews Immunology, 15: 692-704, 2015.

WILHELM B. E. Botánica indígena de Chile. Santiago, Chile, Editorial Andrés Bello, 1999. 94-95p.

## ANEXOS

### Anexo 1. Compuestos fenólicos encontrados en los extractos etanólicos de los diez genotipos de *U. molinae*.

| Rt<br>(min) | [M-H] <sup>-</sup><br>(m/z) | MS <sup>2</sup><br>(m/z) | Tentative identification | ETEs (semiquantification respect to the highest area obtained) |       |                    |       |       |       |       |       |       |       | References |      |   |
|-------------|-----------------------------|--------------------------|--------------------------|--|-------|--------------------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|------------|------|---|
|             |                             |                          |                          | 14-4   | 19-1  | 19-1 <sup>HA</sup> | 8-2   | ZF-18 | 22-1  | 23-2  | 27-1  | 31-1  | 19-2  |            |      |   |
| 1           | 3.2                         | 683                      | 341 179                  | Caffeic acid hexoside dimer                                    | 0.0   | 4.4                | 4.5   | 1.9   | 100.0 | 2.2   | 2.6   | 2.7   | 0.0   | 0.0        | a    |   |
| 2           | 3.3                         | 190                      | 172 84 126               | Quinic acid isomer   | 93.4  | 70.9               | 43.6  | 38.5  | 100.0 | 72.0  | 43.3  | 37.2  | 62.2  | 83.1       | n.i  |   |
| 3           | 3.3                         | 533                      | 190 485                  | Quinic acid derivative   | 36.5  | 82.5               | 18.3  | 12.8  | 100.0 | 64.4  | 17.9  | 12.4  | 35.8  | 19.4       | n.i  |   |
| 4           | 3.3                         | 353                      | 190 172                  | Chlorogenic acid   | 30.1  | 100.0              | 87.1  | 22.2  | 5.4   | 90.7  | 66.4  | 48.1  | 71.4  | 13.2       | b    |   |
| 5           | 3.5                         | 495                      | 343 168 192              | Digalloyl quinic acid  | 8.9   | 36.8               | 100.0 | 62.3  | 10.5  | 7.7   | 94.8  | 73.7  | 15.9  | 69.9       | b    |   |
| 6           | 3.5                         | 783                      | 765 301 274              | Bis-HHDP glucose isomer  | 100.0 | 45.6               | 67.3  | 58.7  | 58.1  | 95.8  | 88.7  | 87.1  | 5.2   | 26.8       | b    |   |
| 7           | 3.5                         | 633                      | 481 300 274              | Galloyl-HHDP glucose   | 100.0 | 27.7               | 33.9  | 42.8  | 24.8  | 35.7  | 49.5  | 31.1  | 4.5   | 85.2       | b    |   |
| 8           | 3.5                         | 483                      | 300 423 168              | Digalloyl glucose  | 100.0 | 40.0               | 32.0  | 42.3  | 29.8  | 49.9  | 25.3  | 25.2  | 17.9  | 83.1       | b    |   |
| 9           | 3.5                         | 331                      | 270 168 240              | Galloyl glucose isomer   | 72.6  | 58.3               | 14.6  | 5.2   | 83.4  | 24.5  | 17.2  | 4.5   | 30.8  | 100.0      | b    |   |
| 10          | 3.5                         | 708                      | 633 785 300              | Unknown ellagitannin isomer                                    | 100.0 | 71.2               | 26.1  | 67.8  | 73.0  | 36.9  | 45.8  | 37.8  | 0.0   | 61.9       | a    |   |
| 11          | 3.6                         | 190                      | 172 84 126               | Quinic acid isomer   | 72.5  | 30.3               | 0.0   | 0.0   | 0.0   | 100.0 | 0.0   | 0.0   | 50.2  | 0.0        | b    |   |
| 12          | 3.9                         | 331                      | 270 168 240              | Galloyl glucose isomer   | 100.0 | 23.8               | 3.9   | 10.3  | 30.9  | 31.9  | 0.0   | 0.0   | 17.9  | 0.0        | b    |   |
| 13          | 3.9                         | 783                      | 765 301 274              | Bis-HHDP glucose isomer  | 25.4  | 8.1                | 0.0   | 0.0   | 12.0  | 100.0 | 6.0   | 0.0   | 1.5   | 0.0        | b    |   |
| 14          | 3.9                         | 483                      | 300 423 168              | Digalloyl glucose isomer                                       | 84.6  | 0.0                | 0.0   | 0.0   | 13.5  | 100.0 | 7.3   | 0.0   | 6.7   | 0.0        | b    |   |
| 15          | 4.0                         | 633                      | 481 300 274              | Galloyl-HHDP glucose isomer                                    | 43.2  | 18.7               | 0.0   | 0.0   | 26.1  | 100.0 | 0.0   | 0.0   | 5.6   | 0.0        | b    |   |
| 16          | 4.0                         | 708                      | 633 785 300              | Unknown ellagitannin isomer                                    | 65.6  | 17.6               | 8.1   | 0.0   | 16.4  | 100.0 | 0.0   | 0.0   | 0.0   | 0.0        | b    |   |
| 17          | 5.1                         | 331                      | 270 168 240              | Galloyl glucose isomer   | 18.7  | 7.9                | 0.0   | 6.8   | 100.0 | 3.4   | 5.8   | 2.8   | 16.7  | 16.5       | b    |   |
| 18          | 5.4                         | 633                      | 481 300 274              | Galloyl-HHDP glucose isomer                                    | 0.0   | 35.4               | 44.9  | 100.0 | 30.4  | 28.9  | 46.3  | 31.6  | 18.1  | 58.3       | b    |   |
| 19          | 5.1                         | 369                      | 206 160 112              | Fraxetin hexoside  | 58.8  | 50.0               | 19.1  | 24.4  | 10.5  | 74.4  | 100.0 | 53.8  | 80.2  | 27.5       | a    |   |
| 20          | 6.2                         | 168                      | 124                      | Gallic acid  | 77.2  | 37.6               | 35.7  | 34.0  | 11.0  | 72.0  | 45.0  | 38.6  | 100.0 | 64.3       | b    |   |
| 21          | 6.6                         | 633                      | 481 300 274              | Galloyl-HHDP glucose isomer                                    | 0.0   | 24.9               | 48.8  | 96.8  | 12.7  | 23.5  | 61.3  | 33.3  | 25.8  | 100.0      | b    |   |
| 22          | 6.8                         | 449                      | 270 210 168              | Gallic acid derivative   | 16.1  | 28.2               | 45.3  | 36.8  | 78.8  | 16.2  | 46.5  | 54.0  | 47.5  | 100.0      | n.i  |   |
| 23          | 8.9                         | 419                      | 313 168                  | Gallic acid derivative   | 52.3  | 29.4               | 25.8  | 49.3  | 36.6  | 28.1  | 68.7  | 53.3  | 49.3  | 100.0      | n.i  |   |
| 24          | 12.4                        | 389                      | 312 168                  | Gallic acid derivative   | 100.0 | 71.9               | 31.2  | 80.4  | 74.1  | 70.1  | 63.6  | 57.1  | 85.7  | 75.3       | n.i  |   |
| 25          | 12.6                        | 783                      | 765 300                  | Bis-HHDP glucose isomer  | 43.3  | 58.1               | 52.4  | 58.7  | 70.8  | 90.8  | 100.0 | 97.2  | 28.4  | 44.7       | b    |   |
| 26          | 13.1                        | 517                      | 365 326 204              | Unknown  | 73.4  | 72.7               | 64.2  | 29.1  | 54.4  | 100.0 | 21.7  | 41.8  | 68.3  | 76.5       | n.i  |   |
| 27          | 13.3                        | 403                      | 313 168                  | Gallic acid derivative   | 100.0 | 15.2               | 20.4  | 29.6  | 44.0  | 27.7  | 55.6  | 30.5  | 0.0   | 74.3       | n.i  |   |
| 28          | 13.8                        | 359                      | 313 168                  | Gallic acid derivative   | 96.5  | 13.4               | 24.6  | 100.0 | 7.0   | 36.2  | 36.8  | 38.0  | 56.5  | 38.3       | n.i  |   |
| 29          | 14.4                        | 423                      | 312 168                  | Gallic acid derivative   | 73.8  | 100.0              | 51.9  | 56.9  | 68.8  | 90.9  | 56.9  | 61.3  | 89.6  | 88.2       | n.i  |   |
| 30          | 14.8                        | 635                      | 465 423 300              | Trigalloyl glucose isomer                                      | 32.0  | 20.8               | 46.0  | 71.2  | 18.5  | 22.0  | 66.0  | 35.0  | 35.4  | 100.0      | a    |   |
| 31          | 15.6                        | 604                      | 450 541 300              | Unknown  | 68.0  | 47.4               | 87.3  | 100.0 | 57.1  | 94.1  | 49.3  | 71.7  | 62.0  | 97.2       | n.i  |   |
| 32          | 15.7                        | 647                      | 495 325                  | Trigalloyl quinic acid isomer                                  | 0.0   | 15.5               | 48.5  | 52.4  | 16.0  | 19.4  | 76.0  | 100.0 | 15.8  | 38.6       | b    |   |
| 33          | 16.6                        | 495                      | 332                      | Quinic acid derivative   | 7.8   | 34.7               | 69.9  | 14.0  | 53.4  | 30.0  | 77.8  | 100.0 | 49.4  | 61.3       | n.i  |   |
| 34          | 17.5                        | 373                      | 168 312                  | Quinic acid derivative   | 58.5  | 51.6               | 28.3  | 50.4  | 0.0   | 74.3  | 27.6  | 42.0  | 100.0 | 68.2       | n.i  |   |
| 35          | 18.3                        | 401                      | 268 160 124              | Benzyl alcohol glycoside                                       | 3.9   | 6.0                | 23.8  | 16.8  | 100.0 | 64.3  | 17.1  | 5.5   | 5.6   | 43.1       | b    |   |
| 36          | 18.6                        | 631                      | 479 435 317              | Galloyl myricetin hexoside                                     | 6.9   | 11.1               | 52.3  | 100.0 | 59.4  | 24.4  | 69.3  | 51.4  | 10.4  | 74.6       | b    |   |
| 37          | 19.0                        | 647                      | 495                      | Trigalloyl quinic acid isomer                                  | 31.7  | 22.9               | 46.1  | 43.2  | 21.1  | 30.1  | 39.3  | 68.6  | 39.7  | 100.0      | b    |   |
| 38          | 19.5                        | 635                      | 465                      | Trigalloyl glucose isomer                                      | 100.0 | 2.8                | 22.3  | 45.8  | 37.5  | 15.7  | 27.5  | 17.9  | 24.6  | 95.9       | a    |   |
| 39          | 19.7                        | 385                      | 152 222 189              | Sinapic acid hexoside  | 52.3  | 26.1               | 53.6  | 27.3  | 28.0  | 50.4  | 50.7  | 44.6  | 42.0  | 100.0      | b    |   |
| 40          | 19.9                        | 373                      | 168 312                  | Gallic acid derivative   | 80.4  | 62.5               | 44.0  | 36.2  | 99.2  | 68.7  | 33.9  | 56.1  | 100.0 | 64.1       | n.i  |   |
| 41          | 20.2                        | 479                      | 332 317 194              | Myricetin methyl ether rhamnoside                              | 10.0  | 9.7                | 48.3  | 35.6  | 15.5  | 15.9  | 80.8  | 63.0  | 10.7  | 100.0      | b    |   |
| 42          | 20.4                        | 467                      | 423 315                  | Galloyl myricetin  | 0.0   | 17.0               | 58.2  | 60.7  | 32.1  | 23.8  | 62.4  | 100.0 | 16.1  | 74.2       | b    |   |
| 43          | 20.5                        | 479                      | 316                      | Myricetin hexoside   | 14.9  | 16.9               | 53.6  | 55.9  | 100.0 | 48.5  | 46.2  | 63.3  | 32.0  | 61.1       | a    |   |
| 44          | 21.2                        | 425                      | 300 178                  | Methylbutenyl tetramethyl ether quercetin                      | 25.5  | 12.7               | 23.6  | 35.8  | 0.0   | 51.3  | 43.9  | 39.4  | 100.0 | 21.9       | b    |   |
| 45          | 24.0                        | 631                      | 479 317                  | Galloyl myricetin hexoside                                     | 5.0   | 28.4               | 89.5  | 61.8  | 29.3  | 35.9  | 12.4  | 44.3  | 42.9  | 100.0      | b    |   |
| 46          | 24.3                        | 449                      | 316 300 194              | Quercetin methyl ether pentoside                               | 9.7   | 100.0              | 30.0  | 35.7  | 68.8  | 60.1  | 24.5  | 27.1  | 29.4  | 42.6       | b    |   |
| 47          | 25.2                        | 641                      | 479 316 178              | Myricetin dihexoside   | 0.0   | 1.0                | 25.6  | 100.0 | 0.0   | 0.0   | 11.3  | 81.8  | 56.7  | 69.7       | 24.1 | b |
| 48          | 27.1                        | 449                      | 316 300 194              | Methyl ether quercetin pentoside                               | 0.0   | 100.0              | 0.0   | 0.0   | 0.0   | 74.1  | 0.0   | 0.0   | 0.0   | 0.0        | b    |   |
| 49          | 28.5                        | 479                      | 316                      | Myricetin hexoside   | 30.6  | 53.8               | 85.7  | 4.1   | 94.9  | 7.9   | 2.8   | 7.2   | 100.0 | 87.8       | a    |   |

Continúa

| Rt<br>(min) | [M-H] <sup>-</sup><br>(m/z) | MS <sup>2</sup><br>(m/z) | Tentative identification | ETEs (semiquantification respect to the highest area obtained) |       |                    |       |       |       |       |       |       |       | References |      |
|-------------|-----------------------------|--------------------------|--------------------------|--|-------|--------------------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|------------|------|
|             |                             |                          |                          | 14-4   | 19-1  | 19-1 <sup>HA</sup> | 8-2   | ZF-18 | 22-1  | 23-2  | 27-1  | 31-1  | 19-2  |            |      |
| 50          | 30.0                        | 493                      | 316 178                  | Myricetin glucuronide  | 0.0   | 0.0                | 96.4  | 0.0   | 100.0 | 0.0   | 0.0   | 30.8  | 0.0   | 44.7       | a    |
| 51          | 31.1                        | 449                      | 316 178                  | Myricetin pentoside  | 0.0   | 100.0              | 0.0   | 0.0   | 0.0   | 50.2  | 0.0   | 0.0   | 0.0   | 0.0        | a    |
| 52          | 31.4                        | 433                      | 300 364                  | Ellagic acid pentoside   | 29.2  | 0.0                | 0.0   | 100.0 | 9.0   | 12.2  | 14.3  | 0.0   | 2.6   | 0.0        | b    |
| 53          | 32.1                        | 615                      | 463 300                  | Galloyl-quercetin hexoside                                     | 10.7  | 18.6               | 56.6  | 5.0   | 100.0 | 5.3   | 26.4  | 9.1   | 34.4  | 64.3       | b    |
| 54          | 32.5                        | 625                      | 463 300                  | Quercetin dihexoside   | 53.1  | 0.0                | 0.0   | 100.0 | 0.0   | 0.0   | 70.2  | 35.4  | 66.8  | 0.0        | a    |
| 55          | 33.6                        | 645                      | 493 331 313              | Galloyl methylmyricetin hexoside                               | 0.0   | 14.7               | 42.6  | 100.0 | 57.5  | 51.9  | 39.8  | 61.8  | 42.3  | 42.5       | b    |
| 56          | 33.7                        | 433                      | 300                      | Ellagic acid pentoside   | 29.8  | 61.1               | 0.0   | 0.0   | 0.0   | 19.0  | 79.3  | 37.3  | 11.5  | 100.0      | b    |
| 57          | 34.2                        | 477                      | 315 300 270              | Methyl ether quercetin hexoside                                | 99.5  | 100.0              | 0.0   | 55.6  | 0.0   | 0.0   | 48.1  | 51.4  | 0.0   | 50.3       | b    |
| 58          | 34.9                        | 449                      | 316 178                  | Myricetin pentoside  | 13.4  | 100.0              | 48.3  | 12.6  | 37.9  | 69.4  | 20.7  | 38.1  | 34.3  | 48.0       | a    |
| 59          | 34.9                        | 333                      | 194 270 166              | Ferulic acid derivative  | 29.9  | 50.4               | 28.5  | 100.0 | 0.0   | 42.7  | 59.5  | 22.7  | 33.3  | 22.6       | n.i. |
| 60          | 36.1                        | 301                      | 256 228                  | Ellagic acid   | 0.0   | 32.2               | 49.2  | 100.0 | 13.2  | 55.5  | 71.9  | 44.2  | 82.0  | 69.1       | b    |
| 61          | 36.3                        | 463                      | 316 178                  | Myricetin rhamnoside   | 38.0  | 82.7               | 63.9  | 12.7  | 88.6  | 12.2  | 20.8  | 12.2  | 90.8  | 100.0      | a    |
| 62          | 36.4                        | 625                      | 463 300                  | Quercetin dihexoside   | 27.9  | 0.0                | 41.7  | 100.0 | 0.0   | 0.0   | 44.6  | 30.6  | 68.3  | 58.6       | a    |
| 63          | 38.4                        | 537                      | 519 375 271              | Amentoflavone  | 45.0  | 26.7               | 36.3  | 49.9  | 28.2  | 36.3  | 25.1  | 37.1  | 34.4  | 100.0      | b    |
| 64          | 38.6                        | 463                      | 300                      | Quercetin hexoside   | 33.5  | 19.8               | 44.4  | 16.7  | 100.0 | 10.6  | 19.9  | 4.1   | 35.2  | 57.1       | a    |
| 65          | 38.9                        | 599                      | 447 313 285              | Galloyl-kaempferol hexoside                                    | 13.9  | 58.2               | 83.2  | 21.5  | 100.0 | 48.0  | 67.3  | 40.9  | 52.7  | 76.1       | b    |
| 66          | 39.0                        | 491                      | 328 475                  | Dimethyl ellagic acid hexoside                                 | 91.2  | 53.1               | 42.5  | 79.3  | 27.4  | 23.8  | 100.0 | 24.2  | 30.0  | 86.5       | b    |
| 67          | 39.5                        | 493                      | 331 475 300              | Dimethyl ether quercetin hexoside                              | 31.5  | 0.0                | 57.2  | 18.5  | 96.7  | 26.7  | 27.4  | 35.0  | 100.0 | 70.3       | b    |
| 68          | 40.3                        | 477                      | 300 433                  | Quercetin glucuronide  | 0.0   | 0.0                | 85.2  | 0.0   | 100.0 | 0.0   | 55.1  | 44.4  | 37.9  | 80.9       | a    |
| 69          | 40.7                        | 421                      | 312 168 150              | Gallic acid derivative   | 14.7  | 32.0               | 22.1  | 19.5  | 26.2  | 23.2  | 20.3  | 100.0 | 15.8  | 20.2       | n.i. |
| 70          | 42.2                        | 629                      | 463 313 301              | Methyl ellagic acid derivative                                 | 0.0   | 0.0                | 26.0  | 100.0 | 82.0  | 29.7  | 14.7  | 12.1  | 34.8  | 23.7       | n.i. |
| 71          | 42.8                        | 433                      | 300                      | Quercetin pentoside  | 0.0   | 100.0              | 0.0   | 0.0   | 0.0   | 96.5  | 0.0   | 0.0   | 0.0   | 0.0        | a    |
| 72          | 45.6                        | 433                      | 300 150 271              | Quercetin pentoside  | 7.9   | 100.0              | 19.4  | 22.6  | 52.7  | 82.1  | 17.5  | 9.3   | 15.5  | 30.8       | a    |
| 73          | 45.9                        | 447                      | 284 327                  | Kaempferol hexoside  | 24.8  | 42.0               | 56.9  | 22.5  | 100.0 | 16.8  | 46.7  | 32.0  | 28.8  | 66.3       | a    |
| 74          | 47.0                        | 433                      | 300                      | Quercetin pentoside  | 0.0   | 98.8               | 0.0   | 0.0   | 0.0   | 100.0 | 0.0   | 0.0   | 0.0   | 0.0        | a    |
| 75          | 48.2                        | 521                      | 270 331                  | Unknown  | 45.7  | 26.6               | 44.1  | 11.3  | 7.0   | 37.1  | 19.2  | 20.3  | 34.9  | 100.0      | n.i. |
| 76          | 49.5                        | 447                      | 300                      | Quercetin rhamnoside   | 18.6  | 16.0               | 15.0  | 29.1  | 100.0 | 28.4  | 40.0  | 8.4   | 28.8  | 88.6       | a    |
| 77          | 52.2                        | 317                      | 298 194 270              | Quercetin methyl eter  | 33.2  | 22.5               | 10.1  | 100.0 | 1.5   | 27.3  | 25.0  | 6.8   | 9.3   | 10.0       | b    |
| 78          | 52.6                        | 439                      | 317 287                  | Unknown  | 63.4  | 40.8               | 47.9  | 100.0 | 35.8  | 43.2  | 90.8  | 64.6  | 34.8  | 78.8       | n.i. |
| 79          | 54.4                        | 317                      | 178 150                  | Myricetin  | 100.0 | 77.0               | 41.4  | 58.6  | 3.5   | 11.5  | 50.6  | 25.3  | 94.6  | 33.7       | a    |
| 80          | 55.9                        | 583                      | 463 300                  | Hydroxybenzoyl quercetin hexoside                              | 17.1  | 20.2               | 52.4  | 41.2  | 79.1  | 49.1  | 62.4  | 36.6  | 33.8  | 100.0      | b    |
| 81          | 55.9                        | 615                      | 463 316                  | Galloyl-myricetin ramoside                                     | 60.1  | 0.0                | 25.5  | 0.0   | 89.5  | 83.2  | 100.0 | 73.1  | 63.3  | 0.0        | b    |
| 82          | 56.3                        | 327                      | 311                      | Unknown  | 27.3  | 8.6                | 23.0  | 100.0 | 30.1  | 21.9  | 19.3  | 13.6  | 15.6  | 9.3        | n.i. |
| 83          | 57.7                        | 625                      | 479 316                  | Myricetin rhamnohexoside                                       | 30.4  | 69.7               | 81.9  | 44.6  | 86.3  | 22.8  | 57.0  | 95.7  | 100.0 | 84.0       | a    |
| 84          | 58.1                        | 479                      | 316                      | Myricetin hexoside   | 59.2  | 16.9               | 100.0 | 81.2  | 53.5  | 17.3  | 52.2  | 45.6  | 49.4  | 80.6       | a    |
| 85          | 58.2                        | 425                      | 316 178 150              | Myricetin derivative   | 100.0 | 0.0                | 0.0   | 82.7  | 0.0   | 0.0   | 11.3  | 0.0   | 7.2   | 0.0        | n.i. |
| 86          | 61.5                        | 609                      | 463 300                  | Quercetin rhamnohexoside                                       | 64.9  | 40.0               | 55.5  | 87.0  | 100.0 | 19.3  | 36.8  | 21.9  | 36.1  | 27.2       | a    |
| 87          | 61.5                        | 639                      | 463 300                  | Caffeoyl-quercetin hexoside                                    | 55.6  | 0.0                | 16.4  | 100.0 | 17.8  | 4.4   | 10.4  | 10.7  | 11.0  | 35.5       | b    |
| 88          | 61.7                        | 701                      | 503                      | Madecassic acid derivative                                     | 100.0 | 27.0               | 28.2  | 60.4  | 28.1  | 0.0   | 0.0   | 0.0   | 50.0  | 41.7       | n.i. |
| 89          | 62.5                        | 519                      | 270 168 210              | Gallic acid derivative   | 100.0 | 29.4               | 23.0  | 43.9  | 0.0   | 22.5  | 37.3  | 16.0  | 49.0  | 35.5       | n.i. |
| 90          | 62.6                        | 425                      | 287 258 329              | Unknown  | 100.0 | 0.0                | 4.3   | 68.8  | 0.0   | 18.3  | 16.2  | 0.0   | 15.5  | 0.0        | n.i. |
| 91          | 63.4                        | 573                      | 316                      | Unknown  | 100.0 | 38.7               | 66.3  | 18.0  | 25.0  | 39.6  | 34.1  | 24.0  | 25.0  | 78.8       | n.i. |
| 92          | 63.8                        | 301                      | 256 178 150              | Quercetin  | 100.0 | 49.7               | 24.9  | 23.2  | 4.6   | 49.6  | 34.3  | 10.9  | 44.3  | 24.7       | a    |
| 93          | 64.1                        | 629                      | 463 300 270              | Ellagic acid derivative  | 0.0   | 33.4               | 33.5  | 0.0   | 76.9  | 0.0   | 56.2  | 9.2   | 0.0   | 100.0      | b    |
| 94          | 66.3                        | 425                      | 287 258 329              | Unknown  | 89.2  | 0.0                | 0.0   | 100.0 | 0.0   | 19.4  | 12.8  | 0.0   | 0.0   | 0.0        | n.i. |
| 95          | 68.0                        | 285                      | 150 284                  | Kaempferol   | 100.0 | 73.3               | 21.1  | 49.2  | 0.0   | 33.4  | 23.3  | 5.6   | 38.8  | 11.5       | a    |
| 96          | 71.4                        | 503                      | 437 389                  | Madecassic acid  | 61.6  | 42.9               | 53.0  | 45.3  | 93.4  | 46.4  | 64.8  | 47.6  | 54.3  | 100.0      | a    |
| 97          | 74.6                        | 487                      | 409                      | Asiatic acid   | 63.2  | 39.9               | 52.7  | 32.3  | 89.0  | 51.2  | 27.3  | 17.9  | 80.0  | 100.0      | a    |
| 98          | 75.6                        | 311                      | 182 169                  | Methylgalate derivative  | 0.0   | 0.0                | 0.0   | 1.1   | 0.0   | 100.0 | 0.0   | 0.0   | 0.0   | 0.0        | n.i. |
| 99          | 76.7                        | 665                      | 503                      | Madecassic acid hexoside                                       | 47.7  | 30.5               | 61.5  | 40.6  | 34.6  | 79.0  | 54.8  | 67.3  | 88.5  | 100.0      | a    |
| 100         | 77.7                        | 311                      | 182 169                  | Methylgalate derivative  | 0.0   | 0.0                | 2.4   | 0.0   | 0.0   | 100.0 | 0.0   | 1.3   | 0.0   | 3.5        | n.i. |
| 101         | 78.1                        | 339                      | 182 169                  | Methylgalate derivative  | 51.4  | 63.2               | 3.6   | 7.6   | 0.0   | 60.7  | 3.6   | 1.3   | 100.0 | 1.4        | n.i. |
| 102         | 79.1                        | 339                      | 182 169                  | Methylgalate derivative  | 100.0 | 0.0                | 1.1   | 0.6   | 0.0   | 94.7  | 0.0   | 1.3   | 40.0  | 0.0        | n.i. |

Rt: tiempo de retención. ETEs: Extractos etanólicos de hojas de *Ugni molinae* Turcz. La identificación de estos compuestos corresponde a un estudio publicado recientemente por Peña-Cerda *et al.* (2016).

**Anexo 2.** Fotografías de testigos de herbario de las hojas de los diez genotipos de *U. molinae*.

**1.1 GENOTIPOS SELECCIONADOS POR CANTIDAD DE HOJAS.**



**Genotipo ZF- 18, *U. molinae***  
SQF 22550



**Genotipo 19-1, *U. molinae***  
SQF 22554



**Genotipo 8-2, *U. molinae***  
SQF 22571



**Genotipo 14-4, *U. molinae***  
SQF 22549



**Genotipo 19-1 <sup>ha</sup>, *U. molinae***  
SQF 22553

## 1.2 GENOTIPOS SELECCIONADOS POR CALIDAD DE FRUTOS



**Genotipo 22-1, *U. molinae***  
SQF 22552



**Genotipo 27-1, *U. molinae***  
SQF 22555



**Genotipo 31-1, *U. molinae***  
SQF 22551



**Genotipo 23-2, *U. molinae***  
SQF 22556



**Genotipo 19-2, *U. molinae***  
SQF 22557

SQF 22556

**Anexo 3.** Fotografías de extracción de taninos y gelatina con  $\text{FeCl}_3$  al 1% (p/v).



Precipitado de los taninos con  
 $\text{FeCl}_3$  1% (p/v).



Reacción con  $\text{FeCl}_3$  1% (p/v) en cada etapa de la extracción de la gelatina. Genotipo ZF-18.

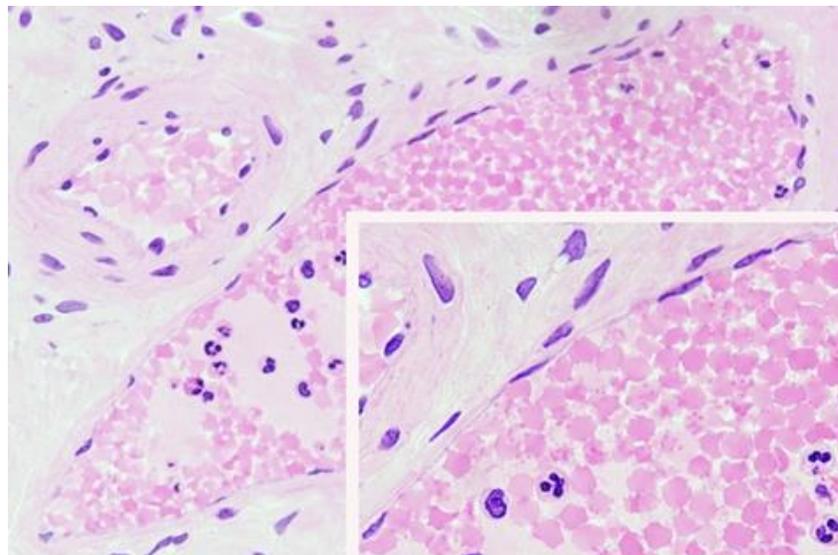
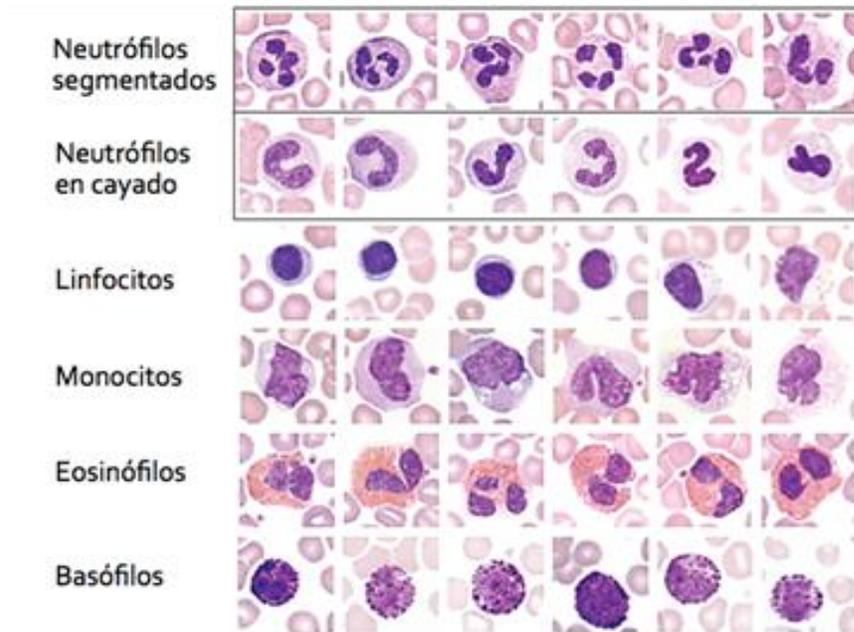
Se observa completa extracción de taninos, en el tercer sobrenadante se aprecia una coloración amarilla ya libre de los compuestos.

El tricloruro férrico en presencia de compuestos fenólicos produce una tonalidad azul oscura.



Reacción con  $\text{FeCl}_3$  1% (p/v) en cada etapa extracción de la gelatina. Genotipo 31-1.  
Se observa completa extracción de taninos.

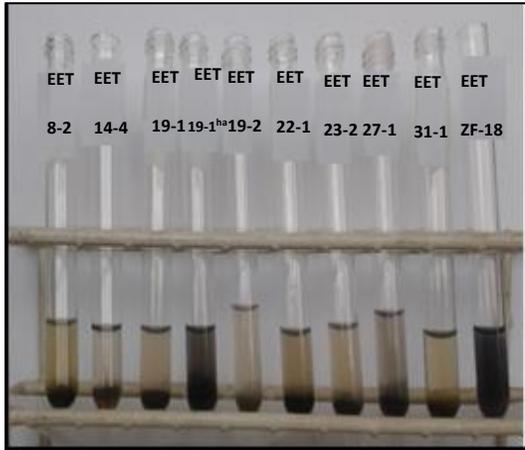
**Anexo 4.** Imágenes de morfología celular utilizada para el conteo celular.



Imágenes utilizadas del texto de Atlas vegetal y animal de la Universidad Vigo.

**Anexo 5.** Fotografías de las reacciones de identificación de taninos en los extractos etanólicos (EETs) de los diez genotipos de *Ugni molinae* Turcz.

**1. Reacción con FeCl<sub>3</sub>**

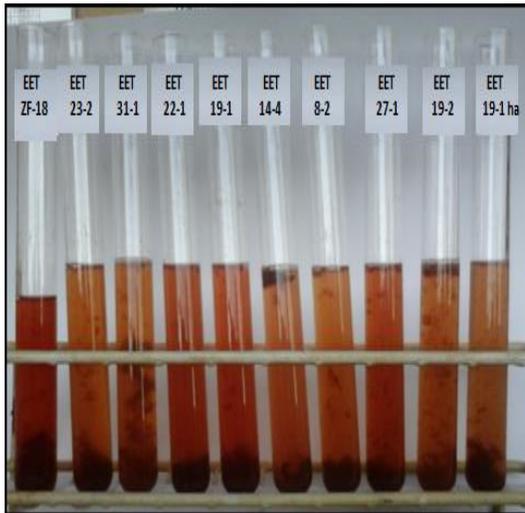


a) Inicio reacción

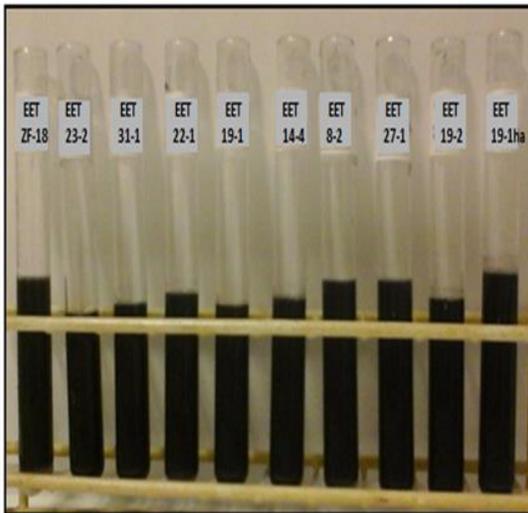


b) Decantado del precipitado

**2. Reacción de Stiasny**

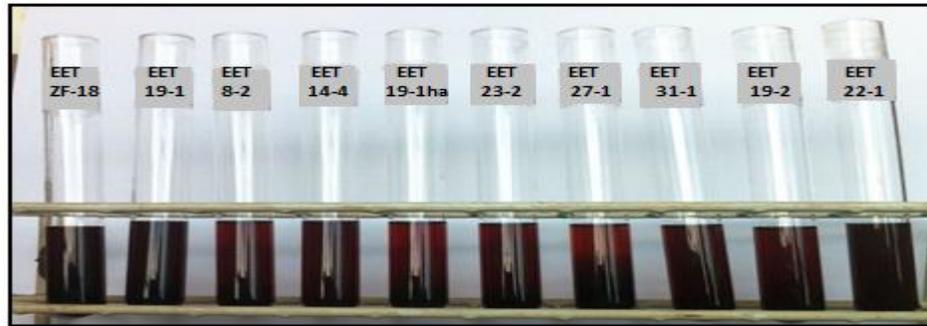


a) Taninos condensados



b) Taninos hidrolizables

### 3. Reacción de oxidación.



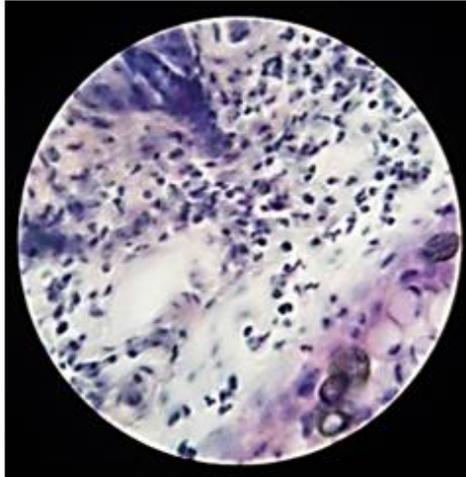
**Anexo 6.** Diferencias significativas entre los diez genotipos de los EETs en relación al contenido de taninos.

| GENOTIPOS              | EET ZF-18 | EET 19-1 | EET 8-2 | EET 14-4 | EET 19-1 <sup>ha</sup> | EET 22-1 <sup>F</sup> | EET 27-1 <sup>F</sup> | EET 23-2 <sup>F</sup> | EET 31-1 <sup>F</sup> | EET 19-2 <sup>F</sup> |
|------------------------|-----------|----------|---------|----------|------------------------|-----------------------|-----------------------|-----------------------|-----------------------|-----------------------|
| EET ZF-18              |           | SI       | SI      | SI       | SI                     | SI                    | SI                    | SI                    | SI                    | SI                    |
| EET 19-1               | SI        |          | SI      | SI       | SI                     | SI                    | SI                    | SI                    | SI                    | SI                    |
| EET 8-2                | SI        | SI       |         | SI       | SI                     | SI                    | SI                    | NO                    | SI                    | SI                    |
| EET 14-4               | SI        | SI       | SI      |          | SI                     | SI                    | SI                    | SI                    | SI                    | SI                    |
| EET 19-1 <sup>ha</sup> | SI        | SI       | SI      | SI       |                        | SI                    | SI                    | SI                    | SI                    | SI                    |
| EET 22-1 <sup>F</sup>  | SI        | SI       | SI      | SI       | SI                     |                       | NO                    | SI                    | SI                    | SI                    |
| EET 27-1 <sup>F</sup>  | SI        | SI       | SI      | SI       | SI                     | NO                    |                       | SI                    | SI                    | SI                    |
| EET 23-2 <sup>F</sup>  | SI        | SI       | NO      | SI       | SI                     | SI                    | SI                    |                       | SI                    | SI                    |
| EET 31-1 <sup>F</sup>  | SI        | SI       | SI      | SI       | SI                     | SI                    | SI                    | SI                    |                       | SI                    |
| EET 19-2 <sup>F</sup>  | SI        | SI       | SI      | SI       | SI                     | SI                    | SI                    | SI                    | SI                    |                       |

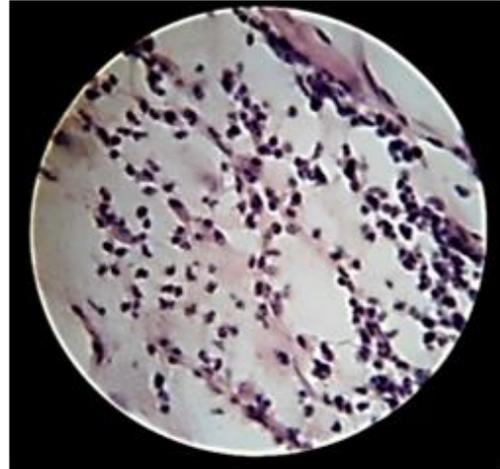
EET: extracto etanólico. SI indica que hay diferencias significativas entre genotipos con un  $p < 0,05$ , análisis estadístico de ANOVA de una vía seguido de test de comparaciones múltiples Tukey. Genotipos con superíndice F indican aquellos genotipos escogidos por calidad de sus frutos. Los cinco genotipos restantes fueron por su cantidad de hojas

**Anexo 7.** Fotografías de infiltración celular de la oreja control solo con TPA y de las orejas tratadas con los extractos de hojas de murtilla, de los genotipos 19-1 y 31-1 a diferentes dosis.

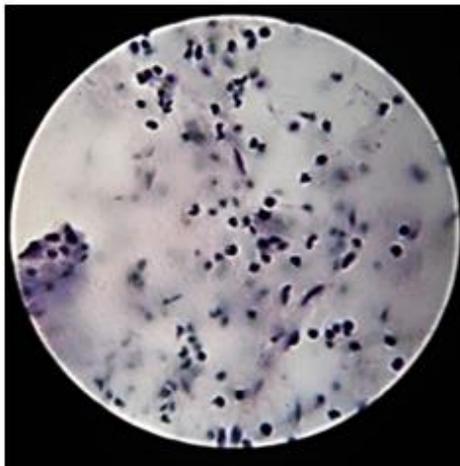
**TPA**



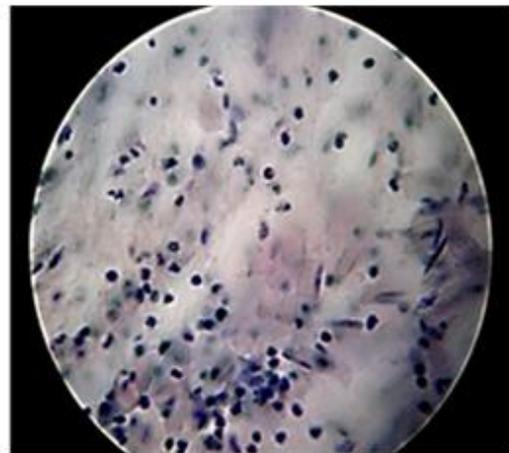
**TPA + EAE 19-1 (50 mg/kg)**



**TPA + EAE 19-1 (100 mg/kg)**

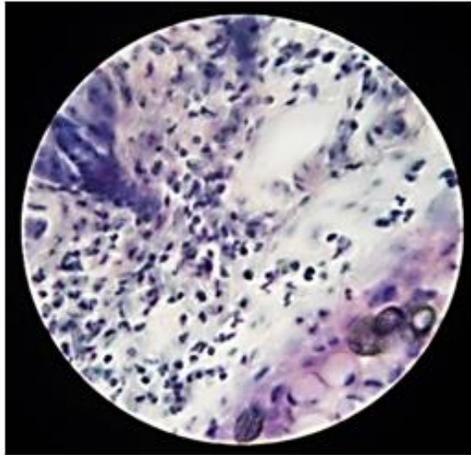


**TPA + EAE 19-1 (150 mg/kg)**

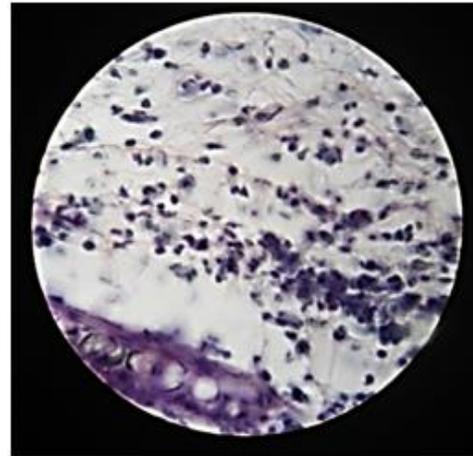


TPA: 12-O-tetradecanoilforbol-13-acetato. EAE: extracto de acetato de etilo.

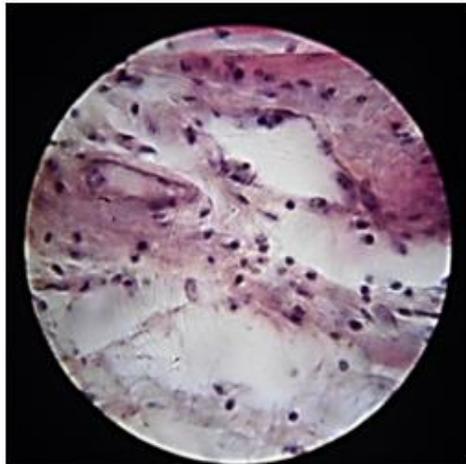
TPA



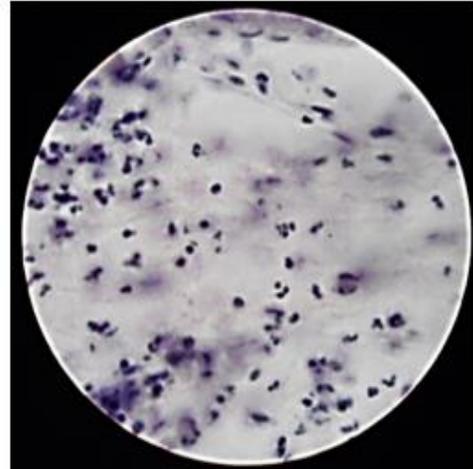
TPA + EET 31-1 (50 mg/kg)



TPA + EET 31-1 (100 mg/kg)



TPA + EET 31-1 (300 mg/kg)



TPA: 12-O-tetradecanoilforbol-13-acetato. EET: extracto etanólico.

## Anexo 8. Resumen de asistencia a congreso.

### Evaluation of leukocyte extravasation inhibition by *Ugni molinae* genotypes

Avello, Zita<sup>1</sup>., Arancibia -Radich, Jorge<sup>1</sup>., Seguel<sup>2</sup>, Ivette.<sup>2</sup>, Delporte, Carla.<sup>1</sup>

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

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

*Ugni molinae* Turcz is a Chilean evergreen shrub, it belongs to the Myrtaceae family and is native to central and southern Chile. Among its denominations are "murtilla ", "murta" or "Ugni".<sup>1</sup>Research conducted in the Laboratory of Natural Products at the Faculty of Chemical and Pharmaceutical Sciences at the University of Chile has recognized pentacyclic triterpenoid derivatives of ursane, oleanane and lupane as: ursolic acid, oleanolic acid, corosolic acid, alphitolic acid, madecassic acid, asiatic acid, betulinic acid and maslinic acid. Which have anti-inflammatory activity<sup>2</sup>. In other studies the presence of phenolic compounds has been reported, such as catechin, epicatechin, myricetin, quercetin, kaempferol, myricetin glycoside, quercetin glycoside, rhamnoside, and gallic acid.<sup>3</sup>The aim of this study was to evaluate comparatively the anti-inflammatory effect, through leukocyte extravasation in a mice model, of ethanol and ethyl acetate extracts from leaves of genotypes of *Ugni molinae* grown in the same soil and climate conditions and with the same agronomic management. The evaluated extracts were selected due to their anti-inflammatory activity *in vivo* in the TPA (phorbol 12 - myristate 13 -acetate) induced inflammation in mice edema ear model. A sample of 6 mm diameter was removed, fixed in 4% paraformaldehyde solution and treated with methanol solutions of increasing concentration to dehydrate it. Afterwards, xylene was added to the sample and finally embedded in paraffin. After this, histological cuts were done. For deparaffinize the sample was hydrated with methanol solutions of decreasing concentration. The sample was stained with hematoxylin and eosin that allowed for the observation and count of leukocytes in the optic microscope. The number of leukocytes in the treated samples and controls samples was determined. With these data, the inhibition percentage of extravasation in the inflamed site was calculated. In the evaluation of the anti-inflammatory effect through the inhibition of leukocyte extravasation, the results showed significant differences between the extracts from different *Ugni molinae* genotypes.

Acknowledgments: We are grateful to FONDECYT, Chile, Grant N° 1130155, CONICYT, Chile Grants N°21130672 and N°21120377. Thank you to INIA (Carillanca, Temuco) for the genotypes.

References: <sup>1</sup>MUÑOZ M., Barrera E., Meza I. In El uso medicinal y alimenticio de plantas nativas y naturalizadas en Chile. Museo de Historia Natural, Santiago, Chile. 1981. Publicación ocasional N°33, pp 52-53. <sup>2</sup>Aguirre M. C., Delporte C., Backhouse N., Erazo S., Letelier M. A., Cassesl B. K., Silva X., AlegríaS., Negrete, R. Topical anti-inflammatory activity of 2a-hydroxy pentacyclic triterpene acids from the leaves of *Ugni molinae*. Bioorganic & Medicinal Chemistry 14: 5673-5677, 2006. <sup>3</sup>RUBILAR M., Pinelo M., Ihl M., Scheuerman E., Sineiro J., Nuñez M. J. Murta Leaves (*Ugni molinae* Turcz) as a Source of Antioxidant Polyphenols. Journal of Agricultural and Food Chemistry 54: 59-64, 2006.

Presentado en el XXXVII Congreso Anual de la Sociedad de Farmacología de Chile (SOFARCHI). Desarrollado del 22 al 25 de Septiembre, 2015. Ciudad Coquimbo.