

**UNIVERSIDAD DE CHILE**

**FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS Y FARMACÉUTICAS**



***INHIBICIÓN DE LA ACTIVIDAD DE ENZIMAS QUE METABOLIZAN  
CARBOHIDRATOS, EFECTOS ANTIOXIDANTES Y EFECTO  
HIPOGLICEMIANTE IN VIVO DE EXTRACTOS FENÓLICOS DE FRUTOS  
DE DISTINTOS GENOTIPOS DE *Ugni molinae****

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

***JOSÉ LUIS ORDÓÑEZ BELMAR***

**Directora de Tesis: Dra. Carla Delporte Vergara**

**Santiago-CHILE**

**Julio 2022**

**UNIVERSIDAD DE CHILE**  
**FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS Y FARMACÉUTICAS**

**INFORME DE APROBACIÓN DE TESIS DE DOCTORADO**

Se informa a la Dirección de la Escuela de Graduados de la Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas que la Tesis de Doctorado presentada por el candidato

**JOSÉ LUIS ORDÓÑEZ BELMAR**

Ha sido aprobada por la Comisión de Evaluadora de Tesis como requisito para optar al grado de Doctor en Ciencias Farmacéuticas, en el examen público rendido el día \_\_\_\_\_

**Directora de Tesis:**

**Dra. Carla Delporte V.**

\_\_\_\_\_

**Co-directores de Tesis:**

**Dra. María Carolina Zúñiga L.**

\_\_\_\_\_

**Dr. Fernando Ezquer R.**

\_\_\_\_\_

**Comisión Evaluadora de Tesis:**

**Dr. Guillermo Díaz Araya**

\_\_\_\_\_

**Dra. Gladys Tapia O.**

\_\_\_\_\_

**Dr. Miguel Reyes P.**

\_\_\_\_\_

**Dr. Edgar Pastene N.**

\_\_\_\_\_

## **AGRADECIMIENTOS**

Agradezco a Dios y a mi familia por estar siempre y en todo momento.

Agradezco a ANID y al Programa de Doctorado en Ciencias Farmacéuticas de la Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas de la Universidad de Chile por el financiamiento y el apoyo para poder desarrollar mis estudios de postgrado.

Agradezco a todas las personas que forman parte de los laboratorios e instituciones que me recibieron, apoyaron y aportaron directa o indirectamente a mi desarrollo profesional en el programa de Doctorado en Ciencias Farmacéuticas. En particular al Laboratorio de Productos Naturales y al Laboratorio de Química Inorgánica y Analítica de la Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas de la Universidad de Chile, al Centro de Medicina Regenerativa de la Facultad de Medicina de la Universidad del Desarrollo y al Grupo para el Estudio de la Salud Cardiometabólica del Instituto Pluridisciplinar de la Universidad Complutense de Madrid.

Fueron tantas y tantos las y los profesores, investigadores, técnicos, laborantes, administrativos, compañeras y compañeros de laboratorios y también amigas y amigos que estuvieron presentes y/o aportaron a mi formación durante mi estadía en el programa de Doctorado que no es correcto nombrar sólo a algunas o a algunos. A todas ellas y todos ellos, muchas gracias.

## **FINANCIAMIENTO**

El desarrollo de esta tesis doctoral ha sido financiado gracias al Proyecto FONDECYT N°1130155 (dirigido por la Dra. Carla Delporte) y a la Beca CONICYT N°21150851 de Doctorado Nacional otorgada a mi persona.

## TABLA DE CONTENIDOS

AGRADECIMIENTOS.....	3
FINANCIAMIENTO.....	4
ÍNDICE DE TABLAS.....	7
ÍNDICE DE FIGURAS.....	9
1. RESUMEN.....	14
2. ABSTRACT.....	16
3. INTRODUCCIÓN.....	18
4. HIPÓTESIS DE TRABAJO.....	32
5. OBJETIVOS.....	32
5.1 OBJETIVO GENERAL.....	32
5.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	32
6. METODOLOGÍA.....	34
6.1 SOLVENTES Y REACTIVOS.....	34
6.2 MATERIAL VEGETAL.....	34
6.3 OBTENCIÓN, CONCENTRACIÓN Y SECADO DE LOS EXTRACTOS.....	36
6.4 DETERMINACIÓN DEL CONTENIDO DE FENOLES TOTALES POR EL MÉTODO FOLIN-CIOCALTEU (FC) DE LOS EXTRACTOS FENÓLICOS.....	37
6.5 CARACTERIZACIÓN QUÍMICA DE LOS COMPUESTOS FENÓLICOS PRESENTES EN LOS EACs.....	38
6.6 ESTUDIOS FARMACOLÓGICOS.....	39
6.6.1 Determinación de la capacidad antioxidante <i>in vitro</i> .....	39
6.6.1.1 Determinación de la capacidad de apagamiento del radical DPPH.....	40
6.6.1.2 Capacidad de absorción de radicales del oxígeno (ORAC).....	41
6.6.1.2.2 Estudio de la capacidad antioxidante mediante el ensayo ORAC-PGR.....	43
6.6.2 Ensayos de inhibición de enzimas que regulan el metabolismo de los carbohidratos.....	44
6.6.2.1 Ensayo de inhibición de la $\alpha$ -glucosidasa.....	44
6.6.2.2 Ensayo de inhibición de la enzima glicógeno fosforilasa A (GPa).....	46
6.7 EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD HIPOGLICEMIANTE <i>IN VIVO</i> DEL EXTRACTO SELECCIONADO POR SU CAPACIDAD ANTIOXIDANTE Y DE INHIBICIÓN ENZIMÁTICA.....	47
6.7.1 Ensayo <i>in vivo</i> en ratones de la cepa BKS.Cg- $m^{+/+}$ Lepr <sup>db</sup> /J.....	48
6.7.2 Cuantificación de la concentración de insulina y adiponectina en muestras de plasma a través de ELISA. 51	
6.7.2.1 Cuantificación de la concentración de adiponectina.....	51
6.7.2.2 Cuantificación de la concentración de insulina.....	52
6.8 CORRELACIÓN DE LAS ACTIVIDADES FARMACOLÓGICAS ESTUDIADAS CON LA COMPOSICIÓN FENÓLICA DE LOS EXTRACTOS EVALUADOS.....	53
6.9 ANÁLISIS ESTADÍSTICO.....	53
7. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	54
7.1 OBTENCIÓN, CONCENTRACIÓN Y SECADO DE LOS EXTRACTOS.....	54
7.2 DETERMINACIÓN DEL CONTENIDO DE FENOLES TOTALES POR EL MÉTODO DE FOLIN-CIOCALTEU (FC) DE LOS EXTRACTOS FENÓLICOS.....	56
7.3 CAPACIDAD ANTIOXIDANTE.....	60
7.3.1 Capacidad atrapadora de radicales DPPH.....	60
7.3.2 Capacidad de neutralizar los radicales del oxígeno (ORAC).....	62
7.3.2.1 Capacidad antioxidante total de frutos de los diferentes genotipos de murtila.....	64
7.3.2.2 Capacidad antioxidante para ORAC-FL de los EACs y EEAs.....	67
7.3.2.3 Capacidad antioxidante para ORAC-PGR de los EACs y EEAs.....	68

7.4	ENSAYO DE INHIBICIÓN DE LA ACTIVIDAD DE $\alpha$ -GLUCOSIDASA .....	71
7.5	ENSAYO DE INHIBICIÓN DE LA ACTIVIDAD DE GLICÓGENO FOSFORILASA A (GPA) .....	73
7.6	CARACTERIZACIÓN QUÍMICA DE COMPUESTOS FENÓLICOS PRESENTES EN LOS EXTRACTOS RICOS EN FENOLES MEDIANTE CLAE-UV-ESI-MS .....	75
7.7	SELECCIÓN DEL EXTRACTO PARA SER EVALUADO EN UN MODELO <i>IN VIVO</i> DE DMT2 .....	76
7.8	ENSAYO <i>IN VIVO</i> EN RATONES OBESOS DIABÉTICOS .....	78
7.8.1	Evaluación del efecto de la administración del extracto sobre la ganancia de peso corporal .....	79
7.8.2	Evaluación del efecto de la administración del extracto sobre el consumo de alimento diario.....	82
7.8.3	Evaluación del efecto de la administración del extracto sobre las glicemias diarias.....	84
7.8.4	Evaluación de la función pancreática de los animales a través de un Test de Tolerancia Oral a la Glucosa (TTOG).....	88
7.8.5	Análisis de muestras de plasma de los animales sometidos a tratamiento en ensayo <i>in vivo</i> .....	91
7.8.5.1	Cuantificación de las concentraciones de adiponectina y de insulina en muestras de plasma .....	92
7.9	CORRELACIÓN DE LAS ACTIVIDADES FARMACOLÓGICAS ESTUDIADAS CON LA COMPOSICIÓN FENÓLICA DE LOS EXTRACTOS EVALUADOS .....	97
8.	CONCLUSIONES .....	100
9.	PRODUCTIVIDAD DERIVADA DEL TRABAJO DE TESIS DOCTORAL .....	102
9.1	PRESENTACIONES EN CONGRESOS.....	102
9.2	PUBLICACIÓN .....	105
10.	BIBLIOGRAFÍA .....	106
11.	ANEXOS.....	112
	ANEXO 1: IDENTIFICACIÓN TENTATIVA Y ANÁLISIS SEMICUANTITATIVO DE COMPUESTOS FENÓLICOS PRESENTES EN LOS EAC DE FRUTOS DE DIFERENTES GENOTIPOS DE <i>U. MOLINAE</i> .....	112
	ANEXO 2: CURVAS PARA DETERMINACIÓN DE CE <sub>50</sub> FRENTE A RADICAL DPPH.....	119
	.....	119
	.....	120
	ANEXO 3: CURVAS DE DECAIMIENTO DE FLUORESCENCIA PARA ORAC-FL Y DE ABSORBANCIA DE ORAC-PGR PARA CAPACIDAD ANTIOXIDANTE TOTAL (CAT) .....	122
	ANEXO 4: CURVAS DE DECAIMIENTO DE FLUORESCENCIA PARA ORAC-FL Y DE ABSORBANCIA DE ORAC-PGR PARA EACs.....	125
	ANEXO 5: CURVAS DE DECAIMIENTO DE FLUORESCENCIA PARA ORAC-FL Y DE ABSORBANCIA DE ORAC-PGR PARA EEAs .....	128
	ANEXO 6: CURVAS DE INHIBICIÓN DE LA ACTIVIDAD DE $\alpha$ -GLUCOSIDASA PARA LOS EEAs Y EACs .....	130
	ANEXO 7: CURVAS DE INHIBICIÓN DE LA ACTIVIDAD DE GLICÓGENO FOSFORILASA A PARA LOS EEAs Y EACs .....	133

## ÍNDICE DE TABLAS

TABLA 1: LISTADO DE LOS GENOTIPOS <i>U. MOLINAE</i> CUYOS FRUTOS FUERON ESTUDIADOS EN ESTE TRABAJO DE TESIS .....	35
TABLA 2: ESQUEMA DE TRABAJO PARA CUANTIFICACIÓN DE FENOLES TOTALES POR MÉTODO DE FOLIN CIOCALTEU .....	38
TABLA 3: ESQUEMA DE TRABAJO PARA EVALUAR CAPACIDAD ANTIOXIDANTE POR DECOLORACIÓN DE RADICAL DPPH .....	40
TABLA 4: ESQUEMA DE TRABAJO PARA EVALUACIÓN DE CAPACIDAD ANTIOXIDANTE POR DECAIMIENTO DE FLUORESCENCIA (ORAC-FL) .....	42
TABLA 5: ESQUEMA DE TRABAJO PARA EVALUACIÓN DE CAPACIDAD ANTIOXIDANTE POR DECAIMIENTO DE ABSORBANCIA (ORAC-PGR).....	43
TABLA 6: ESQUEMA DE TRABAJO PARA EL ENSAYO DE INHIBICIÓN DE LA ACTIVIDAD DE LA A-GLUCOSIDASA. ....	45
TABLA 7: ESQUEMA DE TRABAJO PARA EL ENSAYO DE INHIBICIÓN DE LA ACTIVIDAD DE LA GPA .47	
TABLA 8: RENDIMIENTO PORCENTUAL EN PESO DE FRUTOS SECOS DE MURTILLA.....	54
TABLA 9: RENDIMIENTO PORCENTUAL DE LOS EXTRACTOS SERIADOS OBTENIDOS DESDE FRUTOS DE MURTILLA PROVENIENTE DE LOS 8 GENOTIPOS ESTUDIADOS .....	55
TABLA 10: VALORES DE ABSORBANCIA Y CONCENTRACIÓN DE ÁCIDO GÁLICO PARA CONSTRUIR LA CURVA DE CALIBRADO .....	57
TABLA 11: CONTENIDO DE FENOLES TOTALES DE LOS EACS Y EEAS.....	58
TABLA 12: CONCENTRACIONES EFECTIVAS 50 (CE <sub>50</sub> ) PARA POTENCIA ANTIOXIDANTE FRENTE A RADICAL DPPH DE LOS EACS Y EEAS.....	60
TABLA 13: VALORES DE ÁREA BAJO LA CURVA PROMEDIO Y CONCENTRACIÓN DE TROLOX PARA CONSTRUIR CURVA DE CALIBRADO PARA ORAC-FL.....	63
TABLA 14: VALORES DE ÁREA BAJO LA CURVA PROMEDIO Y CONCENTRACIÓN DE TROLOX PARA CONSTRUIR CURVA DE CALIBRADO PARA ORAC-PGR.....	64
TABLA 15: VALORES ORAC-FL Y ORAC-PGR PARA DETERMINAR LA CAPACIDAD ANTIOXIDANTE TOTAL (CAT) DE FRUTOS DE MURTILLA .....	65
TABLA 16: VALORES DE EQUIVALENTES DE TROLOX PARA EL ENSAYO ORAC-FL DE LOS EACS Y EEAS.....	67
TABLA 17: VALORES DE EQUIVALENTES DE TROLOX PARA EL ENSAYO ORAC-PGR DE LOS EACS Y EEAS.....	69
TABLA 18: POTENCIA INHIBITORIA SOBRE ACTIVIDAD DE A-GLUCOSIDASA DE LOS EACS Y EEAS..71	
TABLA 19: POTENCIA INHIBITORIA SOBRE ACTIVIDAD DE GPA DE LOS EACS Y EEAS .....	73
TABLA 20: CRITERIOS DE SELECCIÓN DEL EAC PARA SER EVALUADO EN UN MODELO <i>IN VIVO</i> DE DMT2.....	77
TABLA 21: REGISTRO DE PESO (G) DIARIO PROMEDIO DE ANIMALES EN ESTUDIO POR GRUPO DE TRATAMIENTO.....	79
TABLA 22: CONSUMO DE ALIMENTO DIARIO PROMEDIO DE ANIMALES EN ESTUDIO POR GRUPO DE TRATAMIENTO.....	82
TABLA 23: CONTROL DE GLICEMIAS DIARIAS PROMEDIO DE ANIMALES EN ESTUDIO POR GRUPO DE TRATAMIENTO.....	85

<b>TABLA 24: TTOG PARA ANIMALES EN ESTUDIO POR GRUPO DE TRATAMIENTO .....</b>	<b>88</b>
<b>TABLA 25: VALORES DE ÁREA BAJO LA CURVA (ABC) PROMEDIO DE CADA GRUPO ENSAYADO PARA TTOG.....</b>	<b>89</b>
<b>TABLA 26: VALORES DE ÁREA BAJO LA CURVA (ABC) PROMEDIO DE CADA GRUPO ENSAYADO PARA TTOG EN FUNCIÓN DEL AÑO DE COSECHA DEL G19-1.....</b>	<b>90</b>
<b>TABLA 27: CONCENTRACIÓN DE ADIPONECTINA EN MUESTRAS DE PLASMA.....</b>	<b>92</b>
<b>TABLA 28: CONCENTRACIÓN DE ADIPONECTINA EN MUESTRAS DE PLASMA EN FUNCIÓN DEL AÑO DE COSECHA DEL G19-1 .....</b>	<b>93</b>
<b>TABLA 29: CONCENTRACIÓN DE INSULINA EN MUESTRAS DE PLASMA.....</b>	<b>94</b>
<b>TABLA 30: CONCENTRACIÓN DE INSULINA EN MUESTRAS DE PLASMA EN FUNCIÓN DEL AÑO DE COSECHA DEL G19-1 .....</b>	<b>95</b>

## ÍNDICE DE FIGURAS

FIGURA 1: CULTIVOS DE MURTILLA DE GENOTIPOS DEL BANCO DE GERMOPLASMA DE INIA-CARILLANCA UTILIZADOS EN ESTE ESTUDIO .....	27
FIGURA 2: BAYAS DE MURTILLA DE CULTIVOS DE INIA-CARILLANCA .....	28
FIGURA 3: ESQUEMA DE TRATAMIENTO PARA ENSAYO <i>IN VIVO</i> CON RATONES DE LA CEPA BKS.CG- <i>M<sup>+/+</sup>LEPR<sup>DB/J</sup></i> .....	49
FIGURA 4: CURVA DE CALIBRADO DE ÁCIDO GÁLICO PARA DETERMINAR EL CONTENIDO DE FENOLES TOTALES .....	57
FIGURA 5: CONTENIDO DE FENOLES TOTALES EN LOS EACS Y EEAS .....	58
FIGURA 6: CONCENTRACIONES EFECTIVAS 50 (CE <sub>50</sub> ) PARA POTENCIA ANTIOXIDANTE FRENTE A RADICAL DPPH DE LOS EACS Y EEAS.....	61
FIGURA 7: CURVA DE CALIBRADO DE TROLOX PARA EL ENSAYO ORAC-FL .....	63
FIGURA 8: CURVA DE CALIBRADO DE TROLOX PARA ORAC-PGR.....	64
FIGURA 9: VALORES ORAC-FL Y ORAC-PGR PARA DETERMINAR LA CAPACIDAD ANTIOXIDANTE TOTAL (CAT) DE 8 GENOTIPOS DE FRUTOS DE MURTILLA. ....	65
FIGURA 10: VALORES DE EQUIVALENTES TROLOX PARA EL ENSAYO ORAC-FL DE LOS EACS Y EEAS.....	68
FIGURA 11: VALORES DE EQUIVALENTES TROLOX PARA EL ENSAYO ORAC-PGR DE LOS EACS Y EEAS.....	69
FIGURA 12: POTENCIA INHIBITORIA SOBRE ACTIVIDAD DE A-GLUCOSIDASA DE LOS EACS Y EEAS	72
FIGURA 13: POTENCIA INHIBITORIA SOBRE ACTIVIDAD DE GPA DE LOS EACS Y EEAS.....	74
FIGURA 14: PESO (G) DIARIO PROMEDIO DE ANIMALES EN ESTUDIO POR GRUPO DE TRATAMIENTO .....	79
FIGURA 15: GANANCIA DE PESO (G) ACUMULADO DE ANIMALES EN ESTUDIO POR GRUPO DE TRATAMIENTO.....	80
FIGURA 16: GANANCIA DE PESO (G) ACUMULADO DE ANIMALES EN ESTUDIO POR GRUPO DE TRATAMIENTO, SEPARADOS POR AÑO DE COSECHA PARA EL EAC G19-1 .....	81
FIGURA 17: CONSUMO DE ALIMENTO (G) DIARIO PROMEDIO DE ANIMALES EN ESTUDIO POR GRUPO DE TRATAMIENTO .....	82
FIGURA 18: CONSUMO DE ALIMENTO ACUMULADO DE ANIMALES EN ESTUDIO POR GRUPO DE TRATAMIENTO.....	83
FIGURA 19: CONSUMO DE ALIMENTO ACUMULADO DE ANIMALES EN ESTUDIO POR GRUPO DE TRATAMIENTO, SEPARADOS POR AÑO DE COSECHA PARA EL EAC G19-1 .....	84
FIGURA 20: VARIACIÓN DE GLICEMIAS DIARIAS DE ANIMALES EN ESTUDIO POR GRUPO DE TRATAMIENTO.....	85
FIGURA 21: VARIACIÓN DE GLICEMIAS DIARIAS DE ANIMALES EN ESTUDIO POR GRUPO DE TRATAMIENTO, SEPARADOS POR AÑO DE COSECHA PARA EL EAC 19-1 .....	86
FIGURA 22: VARIACIÓN DE GLICEMIAS PROMEDIO DIARIAS VERSUS CONSUMO DE ALIMENTO PROMEDIO DIARIO DE ANIMALES EN ESTUDIO POR GRUPO DE TRATAMIENTO.....	87
FIGURA 23: TTOG PARA ANIMALES EN ESTUDIO POR GRUPO DE TRATAMIENTO.....	88
FIGURA 24: VALORES DE ÁREA BAJO LA CURVA (ABC) PROMEDIO DE CADA GRUPO ENSAYADO	

<b>PARA TTOG.....</b>	<b>90</b>
<b>FIGURA 25: VALORES DE ÁREA BAJO LA CURVA (ABC) PROMEDIO DE CADA GRUPO ENSAYADO PARA TTOG SEPARADO POR AÑO DE COSECHA PARA G19-1 .....</b>	<b>91</b>
<b>FIGURA 26: CONCENTRACIÓN DE ADIPONECTINA EN MUESTRAS DE PLASMA.....</b>	<b>93</b>
<b>FIGURA 27: CONCENTRACIÓN DE ADIPONECTINA EN MUESTRAS DE PLASMA.....</b>	<b>94</b>
<b>FIGURA 28: CONCENTRACIÓN DE ADIPONECTINA E INSULINA EN MUESTRAS DE PLASMA .....</b>	<b>95</b>
<b>FIGURA 29: CONCENTRACIÓN DE INSULINA EN MUESTRAS DE PLASMA.....</b>	<b>96</b>

## ABREVIATURAS

AAPH: 2,2-azobis (2-metilpropionamida) dihidrocloruro  
ADA: Asociación Americana de Diabetes  
ADN: Ácido desoxirribonucleico  
ABC: Área bajo la curva  
AGES: Productos finales de glicación avanzada  
ANOVA: Análisis de varianza  
AWA: Mezcla de solvente acetona : agua: ácido acético  
CAT: Capacidad antioxidante total  
CEPEDEQ: Centro de Estudios de Química de la Universidad de Chile  
CE<sub>50</sub>: Concentración efectiva 50  
CFT: Contenido de fenoles totales o Concentración de fenoles totales  
CICUAL: Comité Institucional Para el Cuidado y Manejo de Animales de Laboratorio de la Facultad de Medicina, Clínica Alemana - Universidad del Desarrollo  
CI<sub>50</sub>: Concentración inhibitoria 50  
CLAE-UV-ESI-MS<sup>n</sup>: Cromatografía líquida de alta eficiencia acoplado a detector UV y detector de masa con ionización por electrospray  
CMR: Centro de medicina regenerativa  
dL: Decilitro  
DE: Desviación estándar  
DM: Diabetes Mellitus  
DMSO: Dimetilsulfóxido  
DMT1: Diabetes Mellitus tipo 1  
DMT2: Diabetes Mellitus tipo 2  
DPPH: Radical 2,2-difenil-1-picrilhidrazilo  
EAC: Extracto Acetónico de frutos de murtila  
EAG: Equivalentes de ácido gálico  
EDC: Extracto diclorometánico de frutos de murtila  
EEA: Extracto etanólico ácido de frutos de murtila  
EGTA: Ácido etilen-bis (oxietilenitrilo) tetraacético tetrasódico  
ELISA: Enzyme-linked immunosorbent assay  
EM: Espectrometría de masas  
ENTs: Enfermedades No Transmisibles  
ENS: Encuesta Nacional de Salud  
ER: Retículo endoplásmico  
ES: Extracto seco  
ET: Equivalentes trolox  
ERDNs: Especies reactivas derivadas del nitrógeno  
ERDOs: Especies reactivas derivadas del oxígeno

ES: Extracto seco  
ESI-IT: Ionización por electro-spray con trampa de iones  
FC: Reactivo de Folin-Ciocalteu  
FL: Fluoresceína  
FID o IDF: Federación Internacional de Diabetes  
g: gramo  
GPa: Glicógeno fosforilasa A  
G-1-P: glucosa 1-fosfato  
G19-1: genotipo 19-1  
h (hrs.): hora  
HAT: Transferencia de un átomo de hidrógeno  
HEPES: Ácido N-(2-Hidroxietil)piperazina-N'-(2-etanosulfónico)  
INE: Instituto Nacional de Estadísticas  
INIA: Instituto Nacional de Investigaciones Agropecuarias  
INTA: Instituto de Nutrición y Tecnología de los Alimentos  
IKK $\beta$ : Subunidad catalítica de la Quinasa IK $\beta$   
IL: Interleuquina  
IP: Instituto pluridisciplinar  
Kg: Kilógramo  
KCl: Cloruro de potasio  
L: Litro  
LPN: Laboratorio de Productos Naturales de la Universidad de Chile  
LS: Latitud sur  
MgCl<sub>2</sub>: Cloruro de magnesio  
mg: Milígramo  
mm: Milímetro  
mM: Milimolar  
min: Minuto  
mL: Mililitro  
MINSAL: Ministerio de Salud  
NADPH: Nicotinamida adenina dinucleótido fosfato  
NF- $\kappa$ B: Factor nuclear kappa B  
ng: Nanógramo  
nm: Nanómetro  
nM: Nanomolar  
OMS: Organización Mundial de la Salud  
ORAC: Oxygen radical absorbance capacity  
ORAC-FL: ORAC fluoresceína  
ORAC-PGR: ORAC rojo de pirogalol  
pH: Potencial hidrógeno  
PGR: Rojo de pirogalol

PKC: Proteína quinasa C  
pNPG: p-nitrofenil- $\alpha$ -D-glucopiranosido  
ppm: Partes por millón  
PS: Peso seco  
psi: Libras por pulgada cuadrada  
RAPD: ADN polimórfico amplificado al azar  
ROO: Radical peroxilo  
RP: Fase reversa  
RPM: Revoluciones por minuto  
SET: Transferencia de un electrón  
SEM: Error estándar de la media  
SM: Síndrome metabólico  
Tolox: Ácido 6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametil-cromano-2-carboxílico  
TR: Tiempo de retención  
TTOG: Test de Tolerancia Oral a la glucosa  
UA: Unidades de absorbancia  
UV: Ultravioleta  
UCM: Universidad Complutense de Madrid  
UCh: Universidad de Chile  
UDD: Universidad del Desarrollo  
UI: Unidades internacionales  
USD: Dólares americanos  
V: Volts  
 $\lambda$ : Longitud de onda  
 $\mu$ L: Microlitro  
 $\mu$ g: Microgramo  
 $\mu$ m: Micrómetro  
 $\mu$ M: Micromolar  
% v/v: Porcentaje volumen / volumen  
% p/v: Porcentaje peso / volumen  
° C: Grados celsius

## 1. RESUMEN

Un estado hiperglicémico mantenido en el tiempo conduce a la aparición de múltiples complicaciones de salud asociadas al estrés oxidativo y a diferentes alteraciones metabólicas. Los tratamientos actuales para estados hiperglicémicos no son enteramente efectivos, por lo que la identificación de compuestos químicos de origen natural capaces de reducir la hiperglicemia y prevenir los efectos deletéreos del estrés oxidativo es un campo atractivo para el desarrollo de nuevas alternativas terapéuticas. Entre estas fuentes de origen natural se describen a los frutos de *Ugni molinae* Turcz, conocida popularmente como murtila. Los especímenes silvestres de frutos de murtila han sido los principalmente estudiados, reportándose la presencia de ácidos fenólicos, flavonoides y antocianinas, así como efectos antioxidantes e inhibitorios de enzimas relacionadas con el metabolismo de los carbohidratos. En función de lo anterior es que el objetivo de este trabajo fue correlacionar el perfil fenólico de extractos de frutos provenientes de 8 genotipos de *U. molinae* cultivados en las mismas condiciones edafoclimáticas en el INIA Carillanca con las propiedades antioxidantes y el potencial efecto hipoglicemiante *in vitro*, seleccionando el más activo para un estudio *in vivo*. Se obtuvieron extractos seriados ricos en fenoles con acetona y con mezcla etanol ácido, analizando químicamente los más activos mediante CLAE-UV-ESI-MS. Se utilizaron métodos espectrofotométricos *in vitro* para evaluar sus capacidades antioxidantes y su potencia inhibitoria sobre la actividad de las enzimas  $\alpha$ -glucosidasa y glicógeno foforilasa A. El estudio *in vivo* fue realizado en un modelo animal de Diabetes Mellitus tipo 2. Dieciseis extractos semipurificados, tanto de acetona como de etanol ácido, exhibieron capacidad antioxidante y potencia inhibitoria sobre las enzimas evaluadas. El análisis químico evidenció diferencias en el perfil fenólico entre los extractos, siendo más concentrados en compuestos fenólicos y más potentes en los ensayos farmacológicos *in vitro* los extractos

obtenidos con acetona. Sin embargo, el extracto acetónico seleccionado por sus significativos efectos *in vitro* no demostró efectos benéficos sobre parámetros de control metabólico en el modelo *in vivo*.

Los resultados indican que los extractos acetónicos incluyen una mezcla de compuestos fenólicos capaces de inhibir la actividad de dos enzimas relacionadas con el metabolismo de los carbohidratos y presentan una promisorio capacidad antioxidante *in vitro*, sin embargo, es necesario profundizar los ensayos *in vivo* para poder corroborar los resultados *in vitro*.

Palabras clave: *Ugni molinae*, frutos, antioxidante,  $\alpha$ -glucosidasa, glicógeno fosforilasa A

## 2. ABSTRACT

A sustained hyperglycemic state over the time leads to the appearance of multiple health complications associated with oxidative stress and different metabolic alterations. Current treatments for hyperglycemic states are not entirely effective thus; the identification of chemical compounds from natural sources to reduce hyperglycemia and prevent the deleterious effects of oxidative stress is an attractive field of research for the development of new therapeutic alternatives. Among these natural sources, the fruits of *Ugni molinae* Turcz, popularly known as murtilla, are described. Mainly wild specimens of murtilla fruits have been studied, reporting the presence of phenolic acids, flavonoids, and anthocyanins, as well as antioxidant and inhibitory effects of enzymes related to carbohydrate metabolism.

Based on the above, the aim of this work was to correlate the phenolic profile of fruit extracts from 8 genotypes of *U. molinae* grown under the same edaphoclimatic conditions at INIA-Carillanca with the antioxidant properties and the potential hypoglycemic effects *in vitro*, selecting the most active for an *in vivo* study. Seriated extracts rich in phenols were obtained with acetone and with an ethanol acid mixture, chemically analyzing the most active ones using HPLC-UV-ESI-MS. *In vitro* spectrophotometric methods were used to evaluate its antioxidant capacities and its inhibitory potency on the activity of the enzymes  $\alpha$ -glucosidase and glycogen phosphorylase A. The *in vivo* study was carried out in an animal model of Type 2 Diabetes Mellitus.

Sixteen semi-purified extracts, both from acetone and ethanol acid, showed antioxidant capacity and inhibitory potency on the evaluated enzymes. The chemical analysis showed differences in the phenolic profile among the extracts, with the extracts obtained with acetone being more concentrated in phenolic compounds and more potent in the *in vitro* pharmacological assays. However, the selected acetone extract did not show beneficial effects

on metabolic control parameters in the *in vivo* model.

The results indicate that the acetone extracts include a mixture of phenolic compounds that inhibit the activity of two enzymes related to carbohydrate metabolism and with a promising *in vitro* antioxidant capacity, however, further *in vivo* assay is necessary to corroborate the *in vitro* results.

KEYWORDS: *Ugni molinae*, berries, antioxidant,  $\alpha$ -glucosidase, glycogen phosphorylase A.

### 3. INTRODUCCIÓN

Los avances tecnológicos han permitido logros en salud pública a lo largo de la historia que significaron una disminución o en algunos casos la erradicación de enfermedades transmisibles, tales como la malaria o la tuberculosis. No obstante, la urbanización y el desarrollo de mejores tecnologías aplicadas a la agricultura, la ganadería y el procesamiento de los alimentos permitieron el acceso de la población a comidas con mayor contenido calórico. Si a lo anterior se suman modificaciones a las tecnologías de transporte y automatización de maquinarias, generando una disminución del trabajo físico de la población, se establece un desbalance entre la ingesta y gasto de energía en las actividades cotidianas. Este desbalance energético ha determinado la aparición de enfermedades no transmisibles (ENTs), tales como la obesidad, hipertensión, dislipidemia y Diabetes Mellitus (DM), las cuales, agrupadas en el denominado Síndrome Metabólico (SM), se convirtieron en el principal problema de salud pública en el siglo XXI (Jorquera & Cancino, 2012; Muoio & Newgard, 2008; Zimmet, Alberti, & Shaw, 2001).

La Diabetes Mellitus (DM) se define como una enfermedad metabólica de carácter crónica y degenerativa que, según la Federación Internacional de Diabetes (IDF), en 2019 afectaba a nivel mundial a 463 millones de personas adultas entre los 20 y 79 años. Las proyecciones indican que en los próximos años la cantidad de personas que morirán debido a esta patología aumentará en un 50%, convirtiéndose en el año 2030 en la séptima causa de muerte (ADA, 2021; IDF, 2019; OMS, 2016).

Este desorden metabólico tiene múltiple etiología, la cual desemboca en defectos en la secreción pancreática de insulina o en la acción ineficiente de la misma a nivel de los tejidos, provocando una alteración de la homeostasis de los carbohidratos, lípidos y proteínas. Entre los efectos de esta hormona se describen la supresión de la liberación de ácidos grasos libres,

favorecer la síntesis de triglicéridos en el tejido adiposo, inhibir la producción hepática de glucosa y promover la captación de glucosa en el tejido muscular esquelético y adiposo (Muoio & Newgard, 2008; Surya et al., 2014).

La clasificación de la DM depende de su etiopatogenia y se han descrito cuatro tipos de acuerdo con sus manifestaciones clínicas. Estos son la Diabetes Mellitus Tipo 1 o Diabetes Mellitus Insulino Dependiente (DMT1), Diabetes Mellitus Tipo 2 o Diabetes Mellitus No Insulino Dependiente (DMT2), Diabetes Gestacional y otros tipos específicos de Diabetes, siendo las dos primeras mayoritarias a nivel mundial, con un 90 a 95 % de participación de DMT2 (ADA, 2021; OMS, 2015).

Las personas afectadas por esta patología se caracterizan por presentar una hiperglicemia persistente que puede manifestarse a cualquier edad y con una prevalencia similar en ambos géneros. Sin embargo, existen diferencias en la prevalencia en diversas regiones y etnias. Esta hiperglicemia determina una serie de signos y síntomas que dependen del tipo de DM que padezca la persona. Por ejemplo, para DMT1 se presenta, muchas veces de forma súbita, poliuria, polidipsia, polifagia, pérdida de peso, trastornos visuales y cansancio. Mientras que para DMT2 es común encontrar pacientes con sobrepeso u obesos y con una sintomatología similar a DMT1, pero menos intensa, lo que determina que esta patología sea subdiagnosticada hasta cuando ya han transcurrido varios años de haberla desarrollado (Sapunar, 2016; Surya et al., 2014).

En un estado de hiperglicemia, la glucosa no puede ingresar a las células, lo que determina que este monosacárido sea el principal agente tóxico causante de las complicaciones observadas, generalmente, varios años después del diagnóstico de DM y/o SM. En particular para DMT2, a nivel molecular, la resistencia a la insulina y posterior hiperglicemia se desarrolla como consecuencia de factores inflamatorios (citoquinas) y hormonales, estrés intracelular del

retículo endoplasmático (RE) y la acumulación de subproductos tóxicos derivados de la sobrecarga nutricional en tejidos sensibles a la insulina. Entre los factores que desencadenan están la alteración de la secreción de adiponectina y leptina, lo que a su vez provoca una oxidación incompleta de las grasas y acumulación anormal de triglicéridos, diacilglicerolos y ceramidas que impiden una acción adecuada de la insulina. Además, se han descrito como factores de insulinoresistencia la activación del Factor Nuclear  $\kappa$ B (NF- $\kappa$ B), sobreexpresión de la subunidad catalítica  $\beta$  de la Quinasa I $\kappa$ B (IKK $\beta$ ), aumento de la producción hepática de diferentes interleuquinas (IL-6, IL-1 $\beta$ ) y del Factor de Necrosis Tumoral  $\alpha$  (TNF $\alpha$ ) (Kawahito, Kitahata, & Oshita, 2009; Muoio & Newgard, 2008).

Al no utilizarse eficazmente la glucosa, se producen daños a nivel celular y la activación de diferentes vías de señalización, tales como: i) formación de productos finales de glicación avanzada (AGEs) por oxidación intracelular de glucosa que luego reaccionan con grupos aminos de diversas proteínas celulares, ii) estrés oxidativo debido al aumento de especies reactivas de oxígeno/nitrógeno (ERDOs/ERDNs) iii) activación de las isoformas de proteína quinasa C (PKC) que contribuyen a las complicaciones cardiovasculares por activación de oxidasas dependientes de NADPH, iv) sobreproducción del anión superóxido inducido por la cadena transportadora de electrones en la mitocondria que puede ser el mecanismo central subyacente a todas las rutas destructivas responsables del paradigma diabético (Al-Dalen, Chavez, Martinez, Ferreira, & Leon, 2004; Giacco & Brownlee, 2010; Kawahito et al., 2009).

En particular, el estrés oxidativo contribuye a la resistencia a la insulina debido a que interfieren con las vías de señalización inducida por esta hormona, lo que, entre otros efectos, evita la traslocación del transportador de glucosa GLUT 4 hacia la membrana plasmática, provocando, a su vez, alteraciones en los tejidos afectados tales como ruptura de la barrera de permeabilidad vascular, migración de leucocitos y el desarrollo de un estado inflamatorio

permanente. Las ERDOs han sido implicadas en la génesis y desarrollo de varias patologías crónicas y degenerativas, incluyendo la cirrosis hepática, artritis, aterosclerosis, cáncer, desórdenes autoinmunes, alteraciones cardiovasculares y neurodegenerativas, DM, etc. Algunos mecanismos de las ERDOs que desencadenan las patologías antes mencionadas son el inicio de la peroxidación lipídica, lo que a su vez estimula la glicación de proteínas, inactivación de enzimas y alteraciones en la estructura y función del colágeno y membranas, desempeñando un papel importante en el envejecimiento prematuro como en el desarrollo de las complicaciones crónicas de la DM. Se ha estimado que en pacientes mayores de 65 años la expectativa de vida se reduce entre 3 y 6 años debido a la DM, lo cual alcanza también a pacientes en edad temprana, por lo que compuestos que puedan combatir a estas especies oxidativas, es decir, antioxidantes exógenos, tienen un gran potencial para prevenir estos procesos patológicos o por lo menos atenuarlos (Kawahito et al., 2009; Sarkar & Shetty, 2014). El estado de hiperglicemia crónica define a la DMT2 y SM, condición que conlleva, a largo plazo, al desarrollo de daños a nivel microangiopático (retinopatía, nefropatía y neuropatía) y macrovascular (enfermedad isquémica del corazón, ataque cerebral y enfermedad vascular periférica). En este sentido, la DMT2 se asocia a una disminución en la calidad de vida de las personas que la padecen (Kawahito et al., 2009).

Chile tiene una prevalencia global de DM, según la Encuesta Nacional de Salud (ENS) del año 2016-2017, de 12,3 %, lo que comparado al año 2010 (9,0 %), significó que en 6 años aumentó en más de un 3 %. Si se separa por grupo etario, la tendencia es la misma, pasando de un 15,5 % a un 17,3 % en 6 años para el grupo de 45 a 64 años de edad y de un 25,7 % a un 30,6 % en los mayores de 65 años (MINSAL, 2018). Sobre el 85 % de las personas que padecen DM conoce su condición, sin embargo menos del 20 % de esa población está bien controlada (euglicemia). A nivel sudamericano, según la Federación Internacional de Diabetes

(IDF), en 2019 la prevalencia de DM en la población adulta (20 a 79 años) chilena fue de un 9,8 %, ubicándose en el segundo lugar, tras Brasil. De las cifras anteriores se desprende que la prevalencia de DM, en particular DMT2, aumenta con la edad y que en Chile los pacientes, en general, no alcanzan un nivel de control adecuado de su hiperglicemia (IDF, 2019; MINSAL, 2018; Sapunar, 2016).

Se considera que los adultos mayores tienen 6,8 veces más riesgo de padecer DMT2 en comparación con el grupo de 25 a 44 años y se prevé que la proporción de personas mayores de 65 años aumentará 113 % para el 2035. La expectativa de vida en Chile ha ascendido a 82 años en mujeres y 77 años en los hombres, con un porcentaje superior al 19 % de personas mayores de 60 años (Familia, 2017; INE, 2022). Por su parte, el sobrepeso aumenta el riesgo de padecer DMT2 en 3 veces, la obesidad en 7 veces y la obesidad mórbida lo hace en 60 veces en relación a los eutróficos. En Chile el 22,8 % de los mayores de 15 años tienen obesidad y el 2,3 % obesidad mórbida. Por lo tanto, se requiere que el sistema de salud se adapte a la carga de enfermedad que constituye la DMT2 y diseñar estrategias con efectividad en las intervenciones a lo largo del ciclo vital, focalizándose en la población de mayor riesgo (MINSAL, 2010, 2013, 2018; Sapunar, 2016).

La DM ha implicado una gran carga económica para los sistemas de salud de distintos países, estimándose que entre el 5 y el 20 % del presupuesto disponible para salud se destina para tratar a los pacientes con DM. Esto, en términos absolutos, significa cerca de 750 billones de dólares (USD) anuales, con la posibilidad de incrementarse en 19 % en los próximos 25 años. La distribución de este gasto no es uniforme, encontrándose que el mayor gasto se hace en los países más ricos en contraste a lo que se hace en los países con menores ingresos, que es donde se encuentra el 75 % de la población diabética. En 2014, Chile gastó aproximadamente un 10,2 % de su presupuesto de salud sólo en el tratamiento de la DM (IDF,

2019; MINSAL, 2010; Sapunar, 2016).

A nivel social, la DM lidera las pérdidas en productividad y crecimiento económico, incluyendo días no trabajados, restricciones de actividad diaria, mortalidad y discapacidad permanente causada por la patología. La mayor carga económica es debida a la discapacidad y la muerte causada por la propia enfermedad y sus complicaciones tanto micro como macrovasculares (Zhang et al., 2009).

Las opciones terapéuticas para el tratamiento de la DM, en general, son efectivas, no obstante, hay una serie de pacientes que no logran un adecuado control metabólico incluyendo todas las medidas disponibles en la actualidad. Se debe considerar, además, que aún existen países en donde el acceso a fármacos esenciales como la insulina es complejo (OMS, 2016).

De ahí entonces la necesidad de una búsqueda constante de nuevas alternativas terapéuticas que tengan un menor costo, pero que a la vez sean igual o más efectivas que las que se encuentran actualmente en uso (Giner & Castillo, 2003; Surya et al., 2014).

La OMS, desde hace bastantes años ha reconocido la importancia de las plantas medicinales en el tratamiento y prevención de múltiples enfermedades, así como también su importancia a nivel económico al ser una fuente de descubrimiento de nuevas moléculas que en algunos casos tiene un costo muy inferior a la síntesis de nuevos fármacos.

El regreso del interés científico sobre las plantas medicinales, identificando su riqueza y variedad química, ha impulsado una revalorización de su uso, lo que representa una forma complementaria de curar, reemplazando el empirismo por la explicación científica, armonizando la medicina tradicional con la terapéutica moderna (Montes & Wilkomirsky, 1996). En 2002, la OMS planteó estrategias para incluir las medicinas tradicionales y alternativas en la salud pública centrándose en aspectos como la política, la seguridad, eficacia y calidad, el acceso y el uso racional de éstas (Bodeker & Kronenberg, 2002).

El reino vegetal constituye una importante fuente de componentes activos que son muy diferentes en términos de estructura y propiedades biológicas, dentro de los cuales se describen enzimas, proteínas y compuestos de bajo peso molecular, tales como vitaminas, esteroides, terpenoides, alcaloides, compuestos fenólicos, etc., los cuales han tenido un notable papel en la medicina tradicional de diferentes países. En los últimos años, la prevención del cáncer y enfermedades cardiovasculares se ha asociado con el consumo de frutas frescas, vegetales o infusiones ricas en antioxidantes naturales. Existen múltiples antecedentes en la literatura que sugieren que una mayor ingesta de dichos compuestos se asocia con un menor riesgo de mortalidad por estas enfermedades que incluyen además, la hipertensión, la arteriosclerosis y la DM (Anhê et al., 2013; Arumugam, Manjula, & Paari, 2013; Bahmani et al., 2014; Mohamed, 2013; Pandey & Rizvi, 2009; Surya et al., 2014).

En este sentido, las plantas medicinales pueden convertirse en una alternativa válida con el fin de mejorar la calidad de vida de quienes padecen patologías como DMT2 y SM, resultando de particular interés aquellas que manifiesten tanto propiedades hipoglicemiantes como antioxidantes. De los estudios experimentales, se han identificado varios grupos químicos que tienen alguna actividad hipoglicemiante, dentro de los que se incluyen los polisacáridos heterogéneos, alcaloides, glucopéptidos, terpenos, péptidos, aminas, esteroides, fenoles, lípidos, cumarinas, compuestos azufrados, iones inorgánicos y otros (Giner & Castillo, 2003). Algunos compuestos pertenecientes a los grupos químicos mencionados anteriormente se han ensayado de manera aislada o siendo parte de extractos, es decir, a la forma de mezclas complejas que incluyen agentes pleiotrópicos. La literatura indica que estudios clínicos controlados y la experiencia tradicional confirman que un buen número de extractos utilizados en fitomedicina muestran una buena eficacia, lo que demuestra claramente que el empleo de mezclas complejas tiene efectos beneficiosos en seres humanos. Se argumenta que las

mezclas complejas han sido satisfactoriamente seleccionadas por la naturaleza, presentando enfoques terapéuticos ventajosos sobre compuestos aislados que poseen solo un objetivo terapéutico. No obstante, también se señala la necesidad de aplicar mucha investigación para establecer el modo de acción de estas mezclas, especialmente para encontrar potenciales agentes sinérgicos con aplicaciones mucho más generales (Wink, 2008).

Dentro de los mecanismos de acción que se han propuesto para aliviar la sintomatología producida por la hiperglicemia mantenida, se describe la actividad antioxidante, la regulación de la respuesta inflamatoria y la regulación de enzimas que participan del metabolismo de los carbohidratos, los cuales, en su conjunto permitirían retardar la aparición de sus complicaciones (Anhê et al., 2013; Bahmani et al., 2014). Una de las enzimas que participa en el metabolismo de los carbohidratos es la  $\alpha$ -glucosidasa, localizada en la membrana superficial de las microvellosidades de los enterocitos y que cataliza la hidrólisis de los carbohidratos complejos a disacáridos y monosacáridos absorbibles, lo que causa un incremento en los niveles de glicemia postprandial. Otra enzima es la glicógeno fosforilasa A (GPa), localizada con mayor abundancia en músculo e hígado y en menor proporción en cerebro. Esta enzima es responsable de la liberación de glucosa a partir de glucógeno, en particular, la cerebral para cubrir cortos períodos de anoxia e hipoglicemia a nivel local, la muscular para proveer energía para ser empleada en el mismo tejido y la hepática para proveer glucosa a tejidos extrahepáticos y regular los niveles de glicemia. Por lo tanto, la inhibición de la actividad catalítica de  $\alpha$ -glucosidasa disminuye el influjo de glucosa desde el tracto gastrointestinal, resultando en una disminución de la glicemia postrandial, mientras que inhibir la actividad de la isoforma hepática de la GPa podría reducir la producción y la liberación de glucosa hacia el torrente sanguíneo (Baker, Greenhaff, & Timmons, 2006; Baker, Timmons, & Greenhaff, 2005; Kim, Jeong, Wang, Lee, & Rhee, 2005; Newgard, Hwang, & Fletterick, 1989; Rubilar et al.,

2011).

Para el tratamiento de la DM con fitofármacos, es preciso desarrollar preparados farmacéuticos con principios activos identificados y cuantificados para contar con un producto de óptima calidad que garantice su eficacia y seguridad. Por otro lado y tan importante como la estandarización es la trazabilidad del proceso desde la siembra de la especie vegetal, su cultivo y cosecha, además de la extracción y desarrollo de la formulación, para finalmente realizar el control de calidad del producto farmacéutico.

Se han demostrado los efectos benéficos sobre la hiperglicemia a partir de compuestos químicos contenidos en diferentes órganos vegetales, tales como semillas, cortezas, hojas, flores y frutos de variadas especies, como por ejemplo *Camellia sinensis*, *Vaccinium arctostaphylos*, *Allium sativum*, *Silybum marianum*, entre muchas otras (Bahmani et al., 2014).

Una especie que ha adquirido gran atención en el último tiempo es *Ugni molinae*, la cual ha demostrado interesantes propiedades farmacológicas, incluidas las que benefician a pacientes que padecen DM.

### **3.1 *Ugni molinae***

*U. molinae* Turcz. (Myrtaceae) es una especie nativa Chilena, de carácter arbustiva, común de encontrar en conjunto con otras especies vegetales, formando parte del bosque del centro y sur de Chile. Se distribuye desde la región del Maule hasta la región de Los Lagos (35° a 42° LS), principalmente en la cordillera de la costa y preferentemente en quebradas donde se concentra mayormente la humedad ambiental, aunque también es frecuente de encontrar en terrenos abiertos y degradados así como en las orillas de bosques (M. Avello et al., 2009; Montenegro, 2002; I. Seguel, Peñaloza, Gaete, Montenegro, & Torres, 2000).

Corresponde a un arbusto perenne, que crece según la disponibilidad de agua, alcanzando

los dos metros de altura en zonas de alta pluviosidad. Presenta hojas pecioladas, de 2 a 2,5 cm de longitud, opuestas, sin estípulas, aovado-oblongas, con el ápice agudo en forma de lanza, verdes por encima, glaucas (de un verde más claro) y con puntuaciones por el envés que reflejan las glándulas presentes. Sus ramas nuevas presentan entrenudos cortos, hojas comprimidas y se encuentran cubiertas de vellos. Sus flores son péndulas, solitarias y axilares, presentando cinco sépalos unidos en la base y cinco pétalos, estambres numerosos y un estilo más largo (M. Avello & Pastene, 2005). En la Figura 1 se ilustra un cultivo de *U. molinae* ubicado en la localidad de Tranapunte (38°41'29.6"S; 73°21'13.3"W), Puerto Saavedra, en la Región de la Araucanía, perteneciente al Instituto de Innovaciones Agropecuarias (INIA) en su sede Carillanca.



**Figura 1: Cultivos de murtillo de genotipos del banco de germoplasma de INIA-Carillanca utilizados en este estudio**

Produce bayas globosas con gran cantidad de semillas, carnosas, dulces y aromáticas, con restos de cálices pentámeros y tetrámeros. Estos frutos maduran principalmente en verano, aunque dependiendo de la zona geográfica y las condiciones climáticas en la que se encuentren, esta maduración se retarda hasta el otoño, presentando un intenso color rojo y un

diámetro que varía entre 5 y 15 mm (Hoffman, 1991; López, Vega-Gálvez, Rodríguez, Uribe, & Bilbao-Sainz, 2018). En la Figura 2 se ilustra los frutos de la especie en los cultivos de murtila en INIA-Carillanca.



**Figura 2: Bayas de murtila de cultivos de INIA-Carillanca**

En Chile, se le conoce vulgarmente como “murtila”, “murta” o “uñi”, así como a nivel mundial como “chilean cranberry” y “chilean guava” de la cual se consumen sus frutos de agradable sabor y aroma, ya sean frescos o a través de mermeladas, jarabes, postres y licores. Estas características han determinado un gran interés por esta especie, por lo que su cultivo se ha masificado con fines comerciales (Ah-Hen, Zambra, Aguëro, Vega-Gálvez, & Lemus-Mondaca, 2013; Hoffman, 1991; López et al., 2018; Montenegro, 2002).

Debido a su creciente valor agronómico y comercial se han desarrollado proyectos que promueven su cultivo y mejoramiento genético, así como estrategias para la producción y búsqueda de mercado a nivel internacional. En el año 1996 se comenzó con la domesticación y cultivo de la especie en el INIA-Carillanca con fines productivos. Para tales efectos se recolectaron más de 100 accesiones de *U. molinae* (colección de germoplasma silvestre), en sitios comprendidos entre las regiones del Maule y Los Lagos, en el centro y sur de Chile. Se caracterizaron los suelos en donde se recolectaron los especímenes, se evaluaron los métodos de regeneración, multiplicación y conservación más adecuados para mantener la

integridad de los germoplasmas colectados y se caracterizaron botánica, morfológica, química y molecularmente los distintos ejemplares obtenidos y los resultantes en los jardines de cultivos del INIA. Para la caracterización molecular se utilizó la técnica del ADN polimórfico amplificado al azar (RAPD), analizando 45 entradas de murtila representativas de todos los sitios de colecta. En total se evaluaron treinta y tres partidores seleccionados al azar, seleccionando siete de éstos para los estudios posteriores, sobre la base de la generación de productos amplificados reproducibles. El ADN se extrajo de hojas en crecimiento y los fragmentos amplificados se separaron por electroforesis en geles de agarosa. A partir de los resultados obtenidos, se seleccionaron las variedades superiores en cuanto a rendimiento y calidad de frutos, con el fin de posibilitar la explotación comercial de la especie. Cabe destacar que la especie presenta una alta variabilidad genética, identificándose varios genotipos, los cuales han sido de interés para estudiar su desarrollo y crecimiento bajo las mismas condiciones edafoclimáticas o bajo diferentes regímenes de aporte de nutrientes y agua, estableciéndose cultivos en una misma zona, lo que ha permitido determinar, en base a trabajos de investigación, que las variaciones en el contenido fitoquímico y en las propiedades farmacológicas de la especie son influenciadas por el genotipo (Peña-Cerda et al., 2017; I. Seguel et al., 2000; Ivette Seguel & Torralbo, 2004).

La medicina tradicional les ha atribuido a las hojas de esta especie diversas propiedades terapéuticas, tales como estimulantes, aromáticas, astringentes y analgésicas, empleándose la infusión de sus ramas y hojas para el tratamiento de diarreas y disenterías, así como para el tratamiento de distintos tipos de dolor (Montenegro, 2000; Muñoz, Barrera, & Meza, 1981).

Los estudios realizados con extractos obtenidos desde las hojas provenientes de especímenes silvestres y de distintos genotipos de la especie han mostrado propiedades antiinflamatorias, analgésicas, antimicrobianas, cicatrizantes y antioxidantes. Estas propiedades se han

atribuido principalmente a la presencia de derivados fenólicos y terpénicos (Aguirre et al., 2006; Arancibia-Radich et al., 2016; M. Avello, Bittner, & Becerra, 2013; M. Avello & Pastene, 2005; M. Avello et al., 2014; M. Avello et al., 2009; M. A. Avello, Pastene, Bustos, Bittner, & Becerra, 2013; Delporte et al., 2007; Goity et al., 2013; López et al., 2018; Peña-Cerda et al., 2017; Rodríguez et al., 2014; Rubilar et al., 2006; Suwalsky, Orellana, Avello, & Villena, 2007; Suwalsky, Orellana, Avello, Villena, & Sotomayor, 2006).

Por su parte, para los frutos de murtila se han reportado la presencia de sustancias pécticas, ácidos fenólicos, flavonoides y antocianinas, así como propiedades antimicrobianas, antioxidantes e inhibitorias sobre la actividad de enzimas como la  $\alpha$ -amilasa y la  $\alpha$ -glucosidasa. Sin embargo, a excepción de Alfaro et al. (2013), quienes emplearon tres genotipos del INIA (14-4, 19-1 y 27-1) y Augusto et al. (2014) (14-4) en estudios de capacidad antioxidante, el resto de los trabajos han sido llevados a cabo con especímenes silvestres de *U. molinae* (S. Alfaro et al., 2013; Susana Alfaro, Mutis, Quiroz, Seguel, & Scheuermann, 2014; Augusto et al., 2014; Brito, Areche, Sepúlveda, Kennelly, & Simirgiotis, 2014; Junqueira-Gonçalves et al., 2015; López et al., 2018; Rodríguez et al., 2014; Rubilar et al., 2011; Ruiz et al., 2010; Shene et al., 2009; Taboada et al., 2010).

Recientemente, el Laboratorio de Productos Naturales (LPN) de la Universidad de Chile publicó un estudio relacionado con las propiedades neuroprotectoras de extractos acetónicos y etanólicos ácidos de frutos de murtila de ocho genotipos provenientes del INIA en un modelo celular de la enfermedad de Huntington (Pérez-Arancibia et al., 2021).

Los trabajos publicados para frutos han sido llevados a cabo principalmente con muestras de origen silvestre, no habiéndose explorado aun las propiedades antioxidantes, ni las propiedades moduladoras de la actividad de enzimas involucradas en el metabolismo de los carbohidratos, ni los efectos *in vivo* sobre la DM de los frutos de los distintos genotipos que el

INIA mantiene cultivados en su sede Carillanca.

Por los antecedentes previamente expuestos, en este trabajo de tesis se estudiaron *in vitro*, en forma comparativa, los efectos antioxidantes e inhibidores de la actividad de  $\alpha$ -glucosidasa y glicógeno fosforilasa A de extractos fenólicos de ocho genotipos de *U. molinae*, así como *in vivo* el efecto hipoglicemiante de uno de los extractos seleccionado por sus significativos efectos *in vitro*.

#### **4. HIPÓTESIS DE TRABAJO**

El efecto antioxidante e inhibidor de la actividad de las enzimas  $\alpha$ -glucosidasa y glicógeno fosforilasa A depende de la composición fenólica cuali y cuantitativa de los extractos provenientes de frutos de distintos genotipos de *U. molinae*.

El extracto seleccionado por sus efectos más potentes como inhibidor de la actividad enzimática de  $\alpha$ -glucosidasa y glicógeno fosforilasa A y por sus efectos antioxidantes presentará efectos hipoglicemiantes *in vivo*, además de modular las concentraciones plasmáticas de insulina y adiponectina.

#### **5. OBJETIVOS**

##### **5.1 Objetivo General**

Correlacionar la composición fenólica cuali y cuantitativa de extractos de frutos de distintos genotipos de *U. molinae* con las propiedades antioxidantes y potencial efecto hipoglicemiante en modelos *in vitro* y evaluar en un modelo *in vivo* el efecto hipoglicemiante y antioxidante del extracto más potente en los ensayos *in vitro*.

##### **5.2 Objetivos Específicos**

1. Determinar el contenido de fenoles totales y el perfil de compuestos fenólicos de los extractos de frutos provenientes de diferentes genotipos de *U. molinae*.
2. Evaluar la capacidad antioxidante *in vitro* de los extractos fenólicos de frutos provenientes de diferentes genotipos de *U. molinae* a través de la:

Capacidad de apagamiento de radical DPPH

Capacidad de neutralizar radicales del oxígeno (ORAC)

3. Evaluar el potencial efecto hipoglicemiante a través de ensayos *in vitro* de inhibición de la actividad enzimática de los extractos fenólicos de frutos provenientes de diferentes genotipos de *U. molinae*, para:

α-glucosidasa

Glicógeno fosforilasa A (GPa)

4. Evaluar la actividad hipoglicemiante *in vivo* en un modelo animal de Diabetes Mellitus Tipo 2 del extracto seleccionado por su mejor actividad antioxidante e inhibidora de enzimas que regulan el metabolismo de los carbohidratos a través de:

Determinación de los niveles de glicemia

Determinación del peso corporal

Determinación del consumo de alimento

Determinación de los niveles insulina plasmática

Determinación de los niveles de adiponectina plasmática

5. Correlacionar las actividades farmacológicas estudiadas con la composición fenólica de los extractos evaluados.

## **6. METODOLOGÍA**

### **6.1 Solventes y reactivos**

Diclorometano, acetona, etanol, ácido acético, metanol, acetonitrilo, dimetilsulfoxido, hidróxido de sodio, cloruro de potasio, cloruro de magnesio y quercetina fueron adquiridos a Merck S.A. (Darmstadt, Alemania). Fosfato de sodio, bifosfato de sodio, fosfato de sodio monobásico, molibdato de amonio, verde de malaquita, AAPH (2,2-azobis (2-metilpropionamida) dihidrocloruro), fluoresceína (como sal disódica), rojo de pirogalol, ácido 6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametil-cromano-2-carboxílico (Trolox), 2,2-difenil-1-picrilhidrazilo (DPPH), acarbosa, p-nitrofenil-D-A-glucopiranosido,  $\alpha$ -glucosidasa, ácido N-(2-Hidroxi-etil)piperazina-N'-(2-etanosulfónico) (HEPES), ácido etilen-bis (oxietilenitrilo) tetraacético tetrasódico (EGTA),  $\alpha$ -D-Glucosa 1-fosfato, cafeína, glicógeno y glicógeno fosforilasa A (GPa) fueron adquiridos a Sigma-Aldrich (Chile). Agua Milli-Q fue empleada para las diluciones en todos los experimentos.

### **6.2 Material vegetal**

En abril de 2016 se cosecharon alrededor de 1 kg de frutos maduros de ocho genotipos de *U. molinae* cultivados bajo las mismas condiciones edafoclimáticas en la estación experimental del INIA-Carillanca, en la localidad de Tranapunte, Puerto Saavedra, Región de la Araucanía (38°41'26.5"S 73°21'10.9"W). Los genotipos incluidos en este estudio fueron seleccionados en base a la calidad agrocomercial de sus frutos de acuerdo con estudios previos desarrollados por el INIA. En la Tabla 1 se presentan los ocho genotipos seleccionados para este estudio, el origen de las accesiones (localidad y Región), así como el código empleado para el archivo de una muestra de cada espécimen en el Herbario de la Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas de la Universidad de Chile.

**Tabla 1: Listado de los genotipos *U. molinae* cuyos frutos fueron estudiados en este trabajo de tesis**

<b>Genotipo</b>	<b>Localidad de origen</b>	<b>Código de herbario</b>
<b>14-4</b>	Purén, Araucanía	SQF-22549
<b>19-1</b>	Porma, Araucanía	SQF-22554
<b>19-1ha</b>	Porma, Araucanía	SQF-22553
<b>19-2</b>	Mehuín, Los Ríos	SQF-22557
<b>22-1</b>	Queule, Araucanía	SQF-22552
<b>23-2</b>	Aucar, Los Lagos	SQF-22556
<b>27-1</b>	Aucar, Los Lagos	SQF-22555
<b>31-1</b>	Porma, Araucanía	SQF-22551

Cabe destacar que entre las accesiones se encuentran las variedades registradas por el INIA, Red Pearl (19-1) y South Pearl (27-1). En relación al genotipo 19-1 (G19-1) se trabajó con muestras de la cosecha antes mencionada, es decir, del año 2016 y también con muestras de la cosecha 2017, las cuales fueron comparadas en los estudios *in vitro* y empleadas en el estudio *in vivo* para el grupo de animales tratados con extracto de frutos de murtila.

Cada genotipo fue estudiado en forma independiente, es decir, se obtuvieron extractos independientes para cada uno de ellos y éstos fueron evaluados comparativamente en cada uno de los modelos descritos para esta investigación.

### **6.2.1 Almacenamiento y conservación de los frutos**

Los frutos obtenidos desde los cultivos del INIA-Carillanca se trasladaron al Laboratorio de Productos Naturales (LPN), fueron lavados y secados en un equipo liofilizador de bandeja con la colaboración de la empresa SouthAM. A continuación, en el LPN fueron triturados en un

molino de cuchillos y se almacenaron en bolsas aluminizadas y selladas a temperatura ambiente hasta su utilización. La humedad residual de los frutos liofilizados fue determinada a través de una termobalanza, empleando una muestra de 1 g de cada genotipo.

### **6.3 Obtención, concentración y secado de los extractos**

En Octubre de 2016, 200 g de frutos secos y triturados de cada genotipo se sometieron a un proceso de extracción seriada con 1000 mL de los siguientes solventes: diclorometano, acetona y mezcla etanol : ácido acético al 1 %. El proceso se realizó a temperatura ambiente y con protección de la luz, con volúmenes sucesivos de solvente en una relación de 5:1 con respecto al material vegetal, bajo agitación intermitente, hasta agotamiento del material vegetal, evidenciado por la pérdida paulatina de la coloración del filtrado y la ausencia de residuo en el balón del evaporador rotatorio, luego del proceso de concentración. Una vez finalizado el proceso con un solvente, se secó el material vegetal remanente para cambiar de solvente de extracción. Cada extracto fue concentrado a presión reducida y baja temperatura (40 – 60° C) hasta alcanzar un volumen aproximado de 200 a 400 mL, y a continuación se eliminó totalmente el solvente en una estufa al vacío a temperatura controlada (40 – 60° C), obteniéndose los extractos secos de diclorometano (EDC), de acetona (EAC) y etanol ácido (EEA).

Para los estudios químicos y las evaluaciones farmacológicas *in vitro* se emplearon los extractos ricos en fenoles, es decir, los EACs y los EEAs obtenidos desde los frutos de ocho genotipos de *U. molinae*. Uno de dichos extractos fue seleccionado para el estudio *in vivo* por su capacidad inhibitoria sobre la actividad de las enzimas  $\alpha$ -glucosidasa y glicógeno fosforilasa A, además de su capacidad antioxidante.

#### **6.4 Determinación del contenido de fenoles totales por el método Folin-Ciocalteu (FC) de los extractos fenólicos**

El contenido de fenoles totales (CFT) se determinó mediante el método de FC, en el cual los fenoles presentes en un medio alcalino se oxidan en presencia del reactivo de FC (mezcla de fosfomolibdato y fosfotungstato), formándose un complejo coloreado.

Para tales efectos, se emplearon placas transparentes de 96 pocillos para evaluar la absorbancia de cada muestra en espectrofotómetro Multiskan GO. Se prepararon soluciones de cada extracto en metanol 80 % v/v a una concentración de 2 mg/mL. A cada pocillo se agregaron 30  $\mu$ L de reactivo de FC al 10 % en agua y 30  $\mu$ L de extracto, blanco o estándar. Esta mezcla se pre-incubó por 2 min a 40° C. Posteriormente, se adicionaron 240  $\mu$ L de carbonato de sodio al 5 % en agua, la mezcla se agitó y se incubó a 40° C durante 20 min. Transcurrido el tiempo de incubación, se obtuvo la absorbancia de cada muestra a 765 nm. Los valores obtenidos en cada medición se interpolaron en una curva de calibrado construida con ácido gálico como estándar de referencia, expresándose cada valor en mg de Equivalentes de Acido Gálico (EAG)/g de extracto seco (ES) (Cicco, Lanorte, Paraggio, Viggiano, & Lattanzio, 2009).

En la Tabla 2 se ilustra el esquema de trabajo.

**Tabla 2: Esquema de trabajo para cuantificación de fenoles totales por método de****Folin Ciocalteu**

Reactivos	Estándar (µL)	Blanco (µL)	Muestra (µL)
Extracto de murtilla	-	-	30
Estándar de ácido gálico	30	-	-
Metanol al 80 % (v/v)	-	30	-
Reactivo de FC al 10 %	30	30	30
<b>Incubar 2 min a 40° C</b>			
Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> al 5% (p/v)	240	240	240
Volumen final	300	300	300
<b>Incubar 20 min a 40° C</b>			
<b>Leer absorbancia a una <math>\lambda = 765</math> nm</b>			

Cada muestra fue analizada en triplicado y sus resultados se presentan como promedios, asociados a su desviación estándar.

**6.5 Caracterización química de los compuestos fenólicos presentes en los EACs**

Los EACs de los ocho genotipos fueron analizados por cromatografía líquida de alta eficiencia acoplado a detector UV y detector de masa con ionización por electrospray (CLAE-UV-ESI-MS<sup>n</sup>) en un equipo Esquire 4000 ESI-IT (Bruker Daltonics GmbH, Alemania), empleando una columna Hibar Purospher Star RP-18 (Waters) con un end-capped de 5 µm y 250 mm x 4 mm. Los análisis fueron desarrollados a temperatura ambiente con una inyección de 20 µL de metanol como blanco o de cada extracto disuelto en metanol a una concentración de 100 mg/mL. Se empleó un sistema de gradiente compuesto por 2 fases, (A) ácido fórmico al 4,5 % en agua y (B) Acetonitrilo, de acuerdo a la metodología descrita por Pedro et al. (2016). La gradiente de elución fue: 0–22 min 3 % B, 22–31 min 22 % B, 31–40 85 % B, 40–46 min 85 % B, 46–56 min 100 % B, and 56–65 min 3 % B a un flujo de 1,0 mL/min. La detección UV fue realizada a 280 nm y 360 nm. El proceso de ionización (nebulización) fue desarrollado a

3.000 V empleando nitrógeno como gas nebulizador a 365° C, una presión de 60 psi y un flujo de 10 L/min. Los espectros de masa fueron obtenidos en polaridad negativa. Para el análisis de los cromatogramas y espectrogramas se empleó el software Bruker DataAnalysis 3.2 (Bruker Daltonik GmbH, DE). La identificación de los compuestos se realizó a través de la revisión de la literatura, empleando bases de datos como Respect for Phytochemicals, Massbank y una librería de compuestos obtenida en el Centro de Estudios de Química (CEPEDEQ) de la Universidad de Chile.

Para comparar el perfil fenólico entre los EACs, la concentración relativa de cada compuesto tentativamente identificado fue determinada. El ion molecular de cada compuesto fue seleccionado en el *modo de selección de iones* y sus áreas fueron integradas. El área del peak seleccionado fue normalizada dividiendo el área del peak por la suma de áreas de todos los peaks analizados. Posteriormente, la mayor área normalizada entre los EACs fue asignada con una abundancia relativa del 100 %. Con los resultados obtenidos de la semicuantificación de cada compuesto se compararon los perfiles fenólicos entre los EACs y se determinó si los compuestos identificados estaban relacionados con las actividades farmacológicas analizadas en los ensayos *in vitro* (Myjavcová et al., 2010; Pedro, Granato, & Rosso, 2016). Para los EEAs, el perfil fenólico fue determinado previamente tal como se describió para los EACs (Pérez-Arancibia et al., 2021).

## **6.6 Estudios farmacológicos**

### **6.6.1 Determinación de la capacidad antioxidante *in vitro***

La capacidad antioxidante se evaluó a través de dos metodologías *in vitro*, la capacidad de apagamiento del radical DPPH y la capacidad protectora de los extractos sobre las moléculas sonda de fluoresceína (ORAC-FL) y rojo de pirogalol (ORAC-PGR) frente al ataque de los

radicales peroxilos y alcoxilos (López-Alarcón & Denicola, 2013).

### 6.6.1.1 Determinación de la capacidad de apagamiento del radical DPPH

La metodología para determinar la capacidad antioxidante frente al radical 2,2 difenil-1-picrilhidrazilo (DPPH) fue adaptada con leves modificaciones de acuerdo a lo descrito por Castro et al. (2014), para ser determinada mediante método espectrofotométrico en placas de 96 pocillos, empleando el equipo Thermo Scientific® Multiskan® GO 3.2.

Se prepararon soluciones metanólicas de los EACs a una concentración de 200 ppm y para los EEAs a una concentración de 500 ppm. A partir de cada solución de extracto se obtuvieron distintas diluciones para llevar a cabo el ensayo. A cada pocillo se agregaron 25  $\mu\text{L}$  de extracto o del estándar y 235  $\mu\text{L}$  de solución metanólica de DPPH en concentración 40  $\mu\text{g}/\text{mL}$ . El decaimiento de la absorbancia se registró cada 10 segundos por un período de 90 min, a una temperatura de 20° C y a una longitud de onda de 517 nm.

En la Tabla 3 se ilustra el esquema de trabajo.

**Tabla 3: Esquema de trabajo para evaluar capacidad antioxidante por decoloración de radical DPPH**

Reactivos	Estándar ( $\mu\text{L}$ )	Blanco ( $\mu\text{L}$ )	Muestra ( $\mu\text{L}$ )
Extracto de murtilla	-	-	25
Estándar de quercetina	25	-	-
Metanol	-	25	-
DPPH	235	235	235
Volumen final	260	260	260

**Leer absorbancia cada 10 segundos por 90 min, a 20° C, a una  $\lambda = 517 \text{ nm}$**

Una vez completado el tiempo de lectura, se graficaron las curvas de decaimiento de la absorbancia para cada concentración de extracto ensayada y se comparó contra un blanco

que correspondió a metanol. El estándar de referencia correspondió a quercetina.

A partir de las curvas de decaimiento se obtuvieron las áreas bajo la curva con las que se calcularon los diferentes porcentajes de DPPH remanente, tal como sigue:

$$\% \text{ remanente de DPPH} = (\text{ABC}_{\text{Muestra}} / \text{ABC}_{\text{Blanco}}) \times 100$$

Posteriormente, la concentración de cada extracto fue graficada frente al porcentaje remanente de DPPH con lo que se obtuvo la concentración efectiva 50 (CE<sub>50</sub>) (Castro et al., 2014).

#### **6.6.1.2 Capacidad de absorción de radicales del oxígeno (ORAC)**

La capacidad antioxidante frente a los radicales peroxilos y alcoxilos (ROO<sup>·</sup>) fue llevada a cabo en equipo Synergy HT de Bio-Tek Instruments, Inc, controlado por el software Gen 5. Se evaluó i) la capacidad antioxidante total de extractos de frutos secos triturados obtenidos con mezcla acetona : agua : ácido acético (70:29,5:0,5 v/v/v, AWA) en concentración 40 mg/mL con el objetivo de comparar los resultados con la base de datos del INTA y ii) la capacidad antioxidante de los EACs y EEAs disueltos en metanol a una concentración de 10 mg/mL. A partir de cada solución de extracto se obtuvieron distintas diluciones con tampón fosfato pH 7,4 para llevar a cabo el ensayo (Castro et al., 2014; Ou, Hampsch-Woodill, & Prior, 2001).

##### **6.6.1.2.1 Estudio de la capacidad antioxidante mediante el ensayo ORAC-FL**

Se emplearon microplacas blancas de poliestireno de 96 pocillos para evaluar la fluorescencia de la parte superior con una longitud de onda de excitación de 485/20 nm y con un filtro de emisión de 528/20 nm. La reacción se realizó en un medio tamponado de fosfato de sodio 75 mM (pH 7,4) a un volumen final de 200 µL. A cada pocillo se agregaron 150 µL de fluoresceína (FL) a una concentración final de 48 nM y 25 µL de cada solución de extracto o

estándar. La mezcla se pre-incubó por 7 min a 40° C, antes de añadir 25 µL de una solución de 2,2-azobis (2-metilpropionamida) dihidrocloruro (AAPH) como fuente de radicales peróxidos y alcoxilos, a una concentración final de 18 mM. El decaimiento de la fluorescencia se registró cada 60 segundos por 120 min. Como estándar de referencia se empleó el compuesto 6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcroman-2-carboxílico (trolox) para elaborar una curva de calibrado. El blanco correspondió a una mezcla de FL y AAPH, reemplazando la solución antioxidante (extracto o estándar) por tampón fosfato.

En la Tabla 4 se ilustra el esquema de trabajo

**Tabla 4: Esquema de trabajo para evaluación de capacidad antioxidante por decaimiento de fluorescencia (ORAC-FL)**

Reactivos	Estándar (µL)	Blanco (µL)	Muestra (µL)
Fluoresceína	150	150	150
Estándar de trolox	25	-	-
Extracto de murtilla	-	-	25
Tampón fosfato de sodio	-	25	-
<b>Incubar 7 min a 40° C</b>			
AAPH	25	25	25
Volumen final	200	200	200
<b>Leer fluorescencia cada 60 segundos por 120 min, a 40° C.</b>			

Una vez completado el tiempo de lectura, se graficaron las curvas de decaimiento de la fluorescencia frente al tiempo para posteriormente calcular el área bajo la curva (ABC) de cada extracto, estándar y blanco, siendo  $F_0$  la fluorescencia a los 0 min y  $F$  la fluorescencia a distintos tiempos. El ABC corregida se obtuvo como sigue:

$$ABC \text{ corregida} = ABC_{\text{Muestra}} - ABC_{\text{Blanco}}$$

Los valores de ABC corregida de cada extracto fueron interpolados en curva de calibrado de trolox, expresando la capacidad antioxidante como valores ORAC de equivalentes de trolox

( $\mu\text{moles/L}$ ) por mg de peso seco (PS) o por mg de extracto seco (ES) (Castro et al., 2014; Ou et al., 2001).

#### 6.6.1.2.2 Estudio de la capacidad antioxidante mediante el ensayo ORAC-PGR

Se emplearon microplacas transparentes de poliestireno de 96 pocillos para evaluar el decaimiento de la absorbancia del rojo de pirogalol (PGR) a 540 nm. La reacción se llevó a cabo en un medio tamponado de fosfato de sodio 75 mM (pH 7,4) a un volumen final de 200  $\mu\text{L}$ . A cada pocillo se agregó 150  $\mu\text{L}$  de rojo de pirogalol (PGR) en concentración final 5,0  $\mu\text{M}$  y 25  $\mu\text{L}$  de cada solución de extracto o estándar. La mezcla se pre-incubó por 7 min a 40° C y luego se adicionó 25  $\mu\text{L}$  de AAPH a una concentración de 10 mM. Posteriormente, se registró el consumo de la molécula sonda por el decaimiento progresivo de la absorbancia cada 60 segundos por 120 min.

En la Tabla 5 se ilustra el esquema de trabajo.

**Tabla 5: Esquema de trabajo para evaluación de capacidad antioxidante por decaimiento de absorbancia (ORAC-PGR)**

Reactivos	Estándar ( $\mu\text{L}$ )	Blanco ( $\mu\text{L}$ )	Muestra ( $\mu\text{L}$ )
Rojo de pirogalol	150	150	150
Estándar de trolox	25	-	-
Extracto de murtilla	-	-	25
Tampón fosfato de sodio	-	25	-
<b>Incubar 7 min a 40° C</b>			
AAPH	25	25	25
Volumen final	200	200	200
<b>Leer absorbancia cada 60 segundos por 120 min, a 40° C, a una <math>\lambda = 540 \text{ nm}</math></b>			

Los valores de ORAC-PGR se calcularon del mismo modo descrito para el ensayo ORAC-FL, interpolando los valores de ABC corregida de cada extracto en la curva de calibrado de trolox,

expresando la capacidad antioxidante como valores ORAC de equivalentes de trolox ( $\mu\text{moles/L}$ ) por mg de peso seco (PS) o por mg de extracto seco (ES) (Castro et al., 2014; Lopez-Alarcon & Lissi, 2006).

### **6.6.2 Ensayos de inhibición de enzimas que regulan el metabolismo de los carbohidratos**

Se analizó la potencia inhibitoria de los EACs y EEAs sobre la actividad enzimática de  $\alpha$ -glucosidasa y glicógeno fosforilasa A (GPa) a través de ensayos espectrofotométricos *in vitro* en placas de 96 pocillos, empleando el equipo Thermo Scientific® Multiskan® GO 3.2.

#### **6.6.2.1 Ensayo de inhibición de la $\alpha$ -glucosidasa**

Los EACs, EEAs y acarbosa, empleada como estándar de referencia, se disolvieron en dimetilsulfóxido (DMSO) al 11,5 % en concentración 1,15 mg/mL. A partir de cada solución de extracto o acarbosa se obtuvieron distintas diluciones para llevar a cabo el ensayo. El medio de reacción consistió en 120  $\mu\text{L}$  de tampón fosfato 100 mM (pH 6,8), 20  $\mu\text{L}$  de extracto, o de acarbosa o blanco (DMSO al 11,5 %) y 60  $\mu\text{L}$  de solución de p-nitrofenil- $\alpha$ -D-glucopiranosido (pNPG) en concentración 5 mM. La mezcla se pre-incubó por 15 min a 37° C y, posteriormente, se adicionaron 30  $\mu\text{L}$  de una solución enzimática de  $\alpha$ -glucosidasa, proveniente de *Saccharomyces cerevisiae*, en concentración de 0,1 UI/mL. Junto a los extractos, se evaluó un control no enzimático (sin enzima), un control negativo (sin extracto) y un blanco (sin extracto y sin enzima).

Inmediatamente después de iniciada la reacción, se realizó una lectura de absorbancia de las muestras a 400 nm (Tiempo 0) y, posteriormente, se incubó por 30 min a 37° C, periodo en que el pNPG, sustrato de la enzima, liberó un grupo p-nitrofenol de color amarillento. Al cabo

de los 30 min se realizó una segunda lectura de absorbancia a 400 nm (Tiempo 30).

En la Tabla 6 se ilustra el esquema de trabajo.

**Tabla 6: Esquema de trabajo para el ensayo de inhibición de la actividad de la  $\alpha$ -glucosidasa.**

Reactivos	Blanco ( $\mu$ L)	Control No Enzimático ( $\mu$ L)	Control Negativo ( $\mu$ L)	Muestra ( $\mu$ L)
Tampón fosfato 100 mM	150	150	120	120
DMSO al 11,5%	20	-	20	-
Extracto de murtila o estándar de referencia en DMSO al 11,5%	-	20	-	20
pNPG 5 mM	60	60	60	60
<b>Incubar 15 min a 37° C</b>				
Solución enzimática 0,1 UI/mL	-	-	30	30
Volumen final	230	230	230	230
<b>Leer absorbancia a una <math>\lambda = 400</math> nm, incubar por 30 min a 37° C y volver a leer absorbancia a una <math>\lambda = 400</math> nm</b>				

La absorbancia, para efectos de cálculo del porcentaje de inhibición enzimática, se consideró como la diferencia de lecturas entre el tiempo 30 y tiempo 0. El porcentaje de inhibición de las muestras se calculó a partir de la siguiente ecuación:

$$\% \text{ de inhibición} = \frac{((A_{CN} - A_B) - (A_M - A_{CNE}))}{(A_{CN} - A_B)} \times 100$$

Dónde:  $A_{CN}$  = Absorbancia del control negativo;  $A_B$  = Absorbancia del blanco;  $A_M$  = Absorbancia de la muestra (extracto o estándar);  $A_{CNE}$  = Absorbancia del control no enzimático.

Los porcentajes de inhibición obtenidos se graficaron frente al logaritmo de la concentración de cada extracto ensayado para obtener la concentración inhibitoria 50 ( $CI_{50}$ ), comparándolo con lo obtenido por el estándar de referencia (Kim et al., 2005).

### **6.6.2.2 Ensayo de inhibición de la enzima glicógeno fosforilasa A (GP<sub>a</sub>)**

La actividad de la enzima GP<sub>a</sub> (proveniente de músculo de conejo) fue determinada en dirección a la síntesis de glicógeno a través de la liberación de fosfato desde glucosa-1-fosfato a 22° C. El medio de reacción consistió en DMSO al 14 % en tampón salino que incluyó 50 mM de HEPES, 100 mM de KCl, 2,5 mM de EGTA y 2,5 mM de MgCl<sub>2</sub>.

Los EACs, EEAs y cafeína, empleada como estándar de referencia, se disolvieron en la solución anterior a una concentración de 1,5 mg/mL. A partir de cada solución de extracto o cafeína se obtuvieron distintas diluciones para llevar a cabo el ensayo. Por su parte, se empleó tampón HEPES 50 mM para disolver la glucosa 1-fosfato (G-1-P) a una concentración de 0,25 mM, glicógeno a una concentración de 1 mg/mL y GP<sub>a</sub> a una concentración de 60 µg/mL. A cada pocillo se agregaron 60 µL de extracto, o de control positivo o de blanco (DMSO al 14 %), 35 µL de solución de glicógeno, 35 µL de solución de G-1-P y, en el caso del control negativo y de la muestra, 20 µL de solución de enzimática de glicógeno fosforilasa A. Esta mezcla fue incubada por 20 min a 22° C, al cabo del cual se adicionó 150 µL de solución de detención compuesta por molibdato de amonio en concentración 10 mg/mL y verde de malaquita en concentración 0,38 mg/mL en medio ácido. La mezcla se incubó por 5 min a 22° C, al final de la cual, el fosfato liberado por acción de la enzima, a partir del sustrato G-1-P, generó un aducto coloreado verde, al cual se le midió la absorbancia a 621 nm.

En la Tabla 7 se ilustra el esquema de trabajo.

**Tabla 7: Esquema de trabajo para el ensayo de inhibición de la actividad de la GPa**

Reactivos	Blanco ( $\mu\text{L}$ )	Control No Enzimático ( $\mu\text{L}$ )	Control Negativo ( $\mu\text{L}$ )	Muestra ( $\mu\text{L}$ )
DMSO 14 % en tampón salino	60	-	60	-
Tampón HEPES	20	20	-	-
Extracto de murtila o estándar de referencia en tampón salino con DMSO 14 %	-	60	-	60
Glicógeno en tampón HEPES	35	35	35	35
Glucosa-1-fosfato en tampón HEPES	35	35	35	35
Glicógeno fosforilasa en tampón HEPES	-	-	20	20
<b>Incubar 20 min a 22°C</b>				
Solución de detención	150	150	150	150
Volumen final	300	300	300	300
<b>incubar por 5 min a 22°C y leer absorbancia a una <math>\lambda = 621 \text{ nm}</math></b>				

Los cálculos de las  $CI_{50}$  se realizaron del mismo modo que lo descrito para  $\alpha$ -glucosidasa, con la diferencia que la absorbancia sólo se registró al final del ensayo (Karis, Loughlin, Jenkins, & Healy, 2009).

### **6.7 Evaluación de la actividad hipoglicemiante *in vivo* del extracto seleccionado por su capacidad antioxidante y de inhibición enzimática**

Una vez llevados a cabo los ensayos para determinar el CFT, los ensayos antioxidantes y de inhibición enzimática se seleccionó un extracto para ser aplicado en un ensayo *in vivo* en animales que representan un modelo de DMT2.

Para tales efectos, se organizaron en una tabla los extractos de los ocho genotipos de murtila y se ordenaron de acuerdo a su CFT, capacidad antioxidante y potencia inhibitoria frente la actividad de las enzimas analizadas.

A partir de esta tabla, se seleccionó el extracto que presentó los mejores resultados combinados en todos los ensayos anteriores.

### **6.7.1 Ensayo *in vivo* en ratones de la cepa BKS.Cg- $m^{+/+}$ Lepr<sup>db</sup>/J**

Se emplearon animales macho de la cepa BKS.Cg- $m^{+/+}$ Lepr<sup>db</sup>/J (ratones obesos y diabéticos) y BKS.Cg- $m^{+/-}$ Lepr<sup>db</sup>/J (ratones normales) a partir de las 3 a 4 semanas de vida, los cuales se seleccionaron de acuerdo a su peso corporal y a su nivel de glicemia.

Los animales se mantuvieron en condiciones controladas de humedad y temperatura, con un ciclo de 12 hrs. de luz/oscuridad y con acceso *ad libitum* a agua y alimento. El trabajo fue desarrollado en concordancia con el “Protocolo de Manejo y Cuidados de Animales de Laboratorio” del Comité Institucional Para el Cuidado y Manejo de Animales de Laboratorio (CICUAL) de la Facultad de Medicina, Clínica Alemana - Universidad del Desarrollo.

El inicio del estudio se programó a partir de la obtención de niveles de glicemia por sobre los 200 mg/dL en tres días sucesivos, lo cual determinó que el animal presentaba Diabetes Mellitus.

Se planificó el uso de 32 animales, divididos en 4 grupos de 8 animales cada uno. Los grupos fueron los siguientes:

**Grupo 1:** Control sano, es decir, ratones BKS.Cg- $m^{+/-}$ Lepr<sup>db</sup>/J (ratones normales) que mantuvieron su rutina de alimentación y acceso a agua *ad libitum* por todo el periodo de estudio.

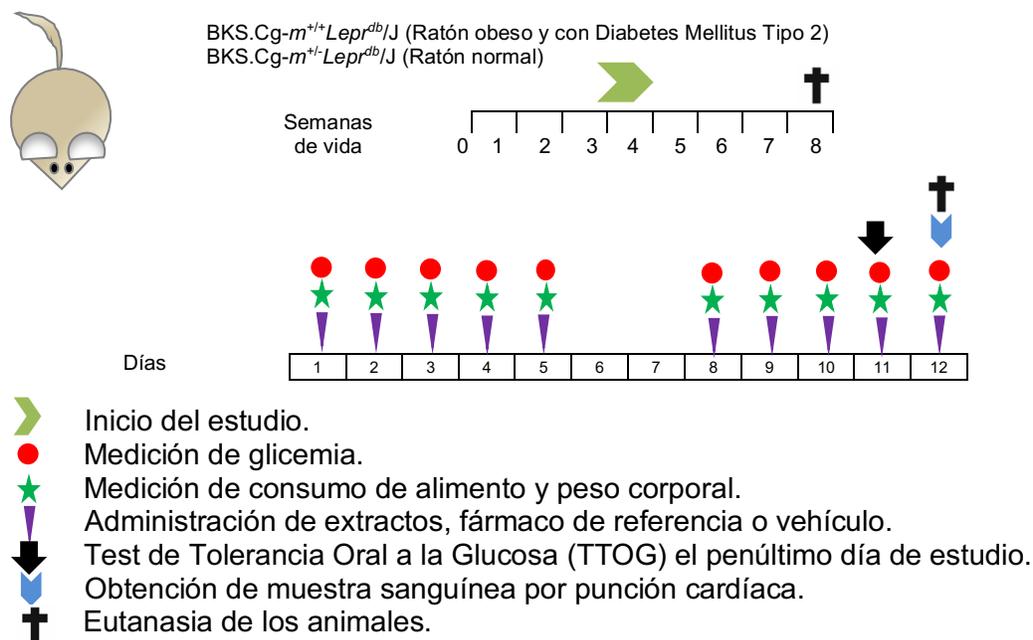
**Grupo 2:** Control positivo, es decir, ratones BKS.Cg- $m^{+/+}$ Lepr<sup>db</sup>/J (ratones obesos y diabéticos) a los cuales se les administró una dosis 300 mg/Kg de metformina, como fármaco de referencia, disuelta en 200  $\mu$ L de agua MilliQ.

**Grupo 3:** Grupo tratado, es decir, ratones BKS.Cg- $m^{+/+}$ Lepr<sup>db</sup>/J (ratones obesos y diabéticos) a los cuales se les administró extracto de murtila a una dosis de 200 mg/Kg de peso, disuelto en 200  $\mu$ L de agua MilliQ.

**Grupo 4:** Control negativo, es decir, ratones BKS.Cg- $m^{+/+}$ Lepr<sup>db</sup>/J (ratones obesos y diabéticos) a los cuales se les administró el vehículo en el que fueron disueltos los extractos o el fármaco de referencia, es decir, agua MilliQ.

El período de estudio contempló 10 días de tratamiento de lunes a viernes. La manipulación comenzó a partir del destete de los animales el día 21 de vida, para la evaluación diaria de parámetros de control metabólico como consumo de alimento, peso corporal y glicemia, para determinar así el inicio del estudio cuando estos presentaban obesidad e hiperglicemia manifiesta.

El esquema de tratamiento se detalla en la Figura 3.



**Figura 3: Esquema de tratamiento para ensayo *in vivo* con ratones de la cepa**

**BKS.Cg- $m^{+/+}$ Lepr<sup>db</sup>/J**

El control de los diferentes parámetros metabólicos se llevó a cabo de acuerdo al siguiente esquema:

Administración de los tratamientos:

- ✓ A las 08:00 hrs. de cada día de estudio, se administraron por vía oral los diferentes tratamientos en un volumen de 200  $\mu$ L, empleando una sonda intragástrica de material polimérico flexible, con punta roma y perforada, la cual se acopló a una jeringa. El volumen fue ajustado en función del peso del animal en estudio, considerando que el volumen antes indicado se calculó para un peso corporal de 40 g.
- ✓ A las 12:00 hrs. de cada día en estudio se midieron los diferentes parámetros de control metabólico.

Control diario:

- ✓ Se midió la cantidad de alimento ingerido por cada animal, empleando una balanza.
- ✓ Se midió el peso corporal de cada animal, empleando una balanza.
- ✓ Se midió la glicemia en 10  $\mu$ L de muestra venosa de sangre, obtenida desde la vena de caudal por corte de la punta de la cola con bisturí. Esta medición se realizó a través de kit comercial AccuChek Performa.

Al final del estudio:

- ✓ Se aplicó un Test de Tolerancia Oral a la Glucosa (TTOG) el día previo a la eutanasia de los animales, es decir el día 9 desde el inicio del estudio. Para tales efectos, en orden cronológico, a las 12:00 hrs. del día 9 de estudio se midió la glicemia en una muestra de sangre venosa obtenida de la cola del animal (Tiempo 0), se administró una solución de carga de glucosa en una dosis de 2 g/kg en 200  $\mu$ L de agua, por vía oral a través de sonda y se obtuvieron muestras de sangre venosa desde la cola del animal para medir la glicemia a los 15, 30, 60, 90, 120 y 150 min de iniciado el test.

- ✓ El día 10 de estudio se obtuvo una muestra de sangre por punción cardíaca de cada animal, los cuales estaban anestesiados con una mezcla de ketamina / xilacina. Estas muestras fueron centrifugadas para obtener el plasma.
- ✓ Las muestras de plasma obtenidos el día de la eutanasia de los animales fueron almacenadas a - 80° C y se trasladaron congeladas al Instituto Pluridisciplinar (IP) de la Universidad Complutense de Madrid (UCM).
- ✓ Estas muestras se destinaron a análisis posteriores de medición de concentración plasmática de insulina y adiponectina. (Attele et al., 2002; Campero, Ezquer, & Ezquer, 2015; Grace et al., 2009; Ju et al., 2008; Sakthi, Vadivu, & Jayshree, 2010).

## **6.7.2 Cuantificación de la concentración de insulina y adiponectina en muestras de plasma a través de ELISA.**

En las muestras de plasma de los ratones que fueron parte del estudio se determinó la concentración de insulina y adiponectina en placas de 96 pocillos a través de kit ELISA comerciales y el empleo de espectrofotómetro Biotek.

### **6.7.2.1 Cuantificación de la concentración de adiponectina**

Para la cuantificación de adiponectina se empleó el protocolo rápido del Kit ab108785 Mouse Adiponectin ELISA (Abcam, Cambridge, Reino Unido). A cada pocillo se agregaron 50 µL de muestra o estándar de adiponectina. La placa se incubó a temperatura ambiente por 120 min. A continuación, cada pocillo se lavó 5 veces con 200 µL de tampón de lavado. Posteriormente, a cada pocillo se agregaron 50 µL de anticuerpo biotinilado de adiponectina y la mezcla se incubó a temperatura ambiente por 60 min. La placa se volvió a lavar 5 veces con 200 µL de tampón de lavado. A continuación, a cada pocillo se agregaron 50 µL de conjugado SP y la

mezcla se incubó a temperatura ambiente por 30 min. La placa se volvió a lavar 5 veces con tampón de lavado. A cada pocillo se agregaron 50  $\mu$ L de sustrato cromógeno y la mezcla se incubó por 25 min a temperatura ambiente. Para finalizar, a cada pocillo se agregaron 50  $\mu$ L de solución de detención y la placa se leyó inmediatamente a 450 nm y a 570 nm, corrigiendo la absorbancia al restar los valores obtenidos entre ambas longitudes de onda.

Las absorbancias corregidas de las muestras se interpolaron en una curva de calibrado (1,5 a 6 ng/mL) de adiponectina expresando la concentración de las muestras en ng/mL.

#### **6.7.2.2 Cuantificación de la concentración de insulina**

Para la cuantificación de insulina se empleó el protocolo rápido del Kit Mercodia Mouse Insulin ELISA (Uppsala, Suecia). A cada pocillo se agregaron 10  $\mu$ L de muestra o estándar y 200  $\mu$ L de conjugado de enzima. La mezcla anterior se incubó a temperatura ambiente por 15 min con agitación constante. A continuación, cada pocillo de la placa se lavó 6 veces con 700  $\mu$ L de tampón de lavado. Posteriormente, a cada pocillo se agregó 200  $\mu$ L de sustrato TMB y la mezcla se incubó a temperatura ambiente por 20 min. Para finalizar, a cada pocillo se agregó 50  $\mu$ L de solución de detención, la placa se agitó y luego se leyó la absorbancia de cada muestra o estándar a 450 nm.

Las absorbancias de las muestras se interpolaron en una curva de calibrado (0 a 5 ng/mL) de insulina expresando la insulinemia en ng/mL.

## **6.8 Correlación de las actividades farmacológicas estudiadas con la composición fenólica de los extractos evaluados**

Los resultados obtenidos del análisis químico cualitativo y semicuantitativo de los extractos ricos en fenoles más activos en los ensayos *in vitro*, sumado a los antecedentes de la literatura de cada compuesto, fueron de utilidad para correlacionar las actividades farmacológicas de los extractos con su contenido de compuestos fenólicos.

## **6.9 Análisis estadístico**

Los resultados obtenidos tanto en los ensayos *in vitro* como *in vivo* fueron analizados mediante estadística descriptiva e inferencial. Se calcularon promedios, desviaciones estándar (DE) y/o error estándar de la media (SEM) y se llevaron a cabo comparaciones entre los diferentes extractos y grupos en estudio, los cuales dependieron del modelo de distribución al que se ajustaron los datos. Para tales efectos, se aplicaron inicialmente test de Shapiro-Wilk y, posteriormente, test paramétricos, como ANOVA de una y dos vías y test de comparaciones múltiples de Tukey o no paramétricos, como el test de Kuskall-Wallis seguido de un test de Dunn. Se empleó el software GraphPad Prism 6, considerando diferencias significativas para valores de  $p \leq 0,05$ . Las diferencias significativas entre los diferentes extractos y genotipos evaluados se evidencian en las tablas, indicadas con letras distintas.

## 7. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 7.1 Obtención, concentración y secado de los extractos

1 kg de frutos frescos de cada genotipo fueron sometidos a un proceso de secado por liofilización. La Tabla 8 ilustra las cantidades de frutos secos obtenidos de cada genotipo con sus correspondientes humedades residuales. Cabe destacar que el G19-1 aparece en 2 filas, correspondiendo a las cosechas del año 2016 y 2017, lo cual se indica entre paréntesis.

**Tabla 8: Rendimiento porcentual en peso de frutos secos de murtilla**

<b>Genotipo</b>	<b>Peso fruto fresco (Kg)</b>	<b>Peso fruto seco (Kg)</b>	<b>Humedad residual (%)</b>	<b>Rendimiento en peso de fruto seco (%)</b>
<b>14-4</b>	1,0007	0,2813	3,3	28,1
<b>19-1 (2016)</b>	1,0019	0,2560	2,2	25,2
<b>19-1 (2017)</b>	0,8255	0,2330	5,6	28,2
<b>19-1ha</b>	1,0041	0,2683	1,6	26,7
<b>19-2</b>	1,0042	0,2226	2,9	22,1
<b>22-1</b>	1,0009	0,2595	2,1	25,9
<b>23-2</b>	1,0042	0,1910	2,8	19,0
<b>27-1</b>	1,0290	0,2172	1,3	21,1
<b>31-1</b>	1,0005	0,2967	1,8	29,6

De acuerdo con la Tabla 8, los frutos perdieron entre un 70 y 80 % de peso durante el proceso de liofilizado, lo cual permitió obtener 200 a 300 g de fruto seco para el proceso de extracción, con humedades residuales del orden del 2 %, salvo en el caso de la cosecha 2017 del G19-1 que presentó una humedad residual de 5,6 %.

Con los frutos secos y triturados, se procedió a extraer, concentrar y secar los extractos que contenían los compuestos químicos de interés. La Tabla 9 ilustra los rendimientos de cada extracto.

**Tabla 9: Rendimiento porcentual de los extractos seriados obtenidos desde frutos de murtilla proveniente de los 8 genotipos estudiados**

<b>Genotipo</b>	<b>Peso inicial (g)</b>	<b>EDCs (%)</b>	<b>EACs (%)</b>	<b>EEAs (%)</b>
<b>14-4</b>	200,0	1,2	3,0	12,7
<b>19-1 (2016)</b>	200,0	2,6	1,2	24,2
<b>19-1 (2017)</b>	200,0	n.d.	8,5	n.d.
<b>19-1ha</b>	200,0	2,4	1,2	23,3
<b>19-2</b>	200,0	2,4	2,8	23,1
<b>22-1</b>	200,0	2,4	1,2	18,5
<b>23-2</b>	180,0	1,6	1,8	22,4
<b>27-1</b>	200,0	2,4	2,0	24,2
<b>31-1</b>	200,0	3,9	1,3	23,2

EDCs: extractos diclorometano; EACs: extractos acetónicos; EEAs: extractos etanólicos ácidos; n.d.: No determinado.

De acuerdo con los resultados ilustrados en la Tabla 9, los rendimientos de los EDCs y EACs fluctuaron entre el 1 y el 4 %, mientras que para los EEAs varió entre un 12 y un 24 %. Se puede notar que para la cosecha 2017 del G19-1 sólo se indica el rendimiento porcentual del EAC. Si bien los EDCs y los EEAs se obtuvieron para la cosecha 2017, éstos no se llevaron a sequedad, sólo realizando este proceso con el EAC que fue utilizado para los ensayos farmacológicos. Como se mencionó en la metodología, los procesos de secado de los frutos frescos y los procesos extractivos aplicados fueron los mismos para los 8 genotipos, así como para ambas cosechas del G19-1, por lo que la diferencia en rendimiento de 8 veces entre los EACs del G19-1 de los años 2016 y 2017 pudieron deberse a una variación en la composición de los frutos, lo cual también pudo influenciar la variación de las humedades residuales ilustradas en la Tabla 8, en que los frutos cosechados el año 2017 mostraron un valor más alto que los cosechados en el año 2016.

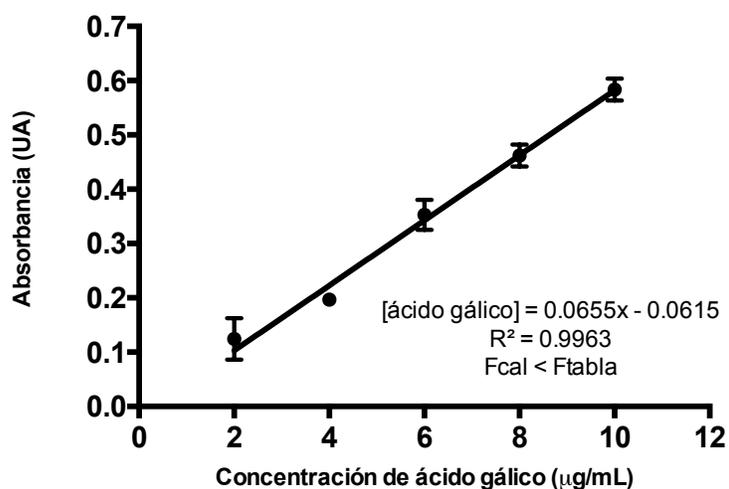
En función de que el trabajo se enfocó en analizar el perfil químico y farmacológico de los extractos fenólicos obtenidos desde los frutos de distintos genotipos de *U. molinae*, los experimentos fueron llevados a cabo con los EACs y EEAs. Los extractos secos empleados en los ensayos farmacológicos mostraron una consistencia pastosa de un color rojo o rojo marrón intenso y fueron almacenados fraccionados en tubos eppendorf de 1,5 mL a -80° C hasta su utilización. En relación a la diferencia en los rendimientos obtenidos con cada solvente de extracción para cada serie de extractos, se puede mencionar que se debe a las polaridades de los componentes de cada extracto y su afinidad por el solvente empleado. Es así como el diclorometano extrajo principalmente compuestos lipofílicos, mientras que acetona y la mezcla de etanol / ácido acético extrajeron principalmente compuestos más polares como los compuestos fenólicos e hidratos de carbono simples y complejos, tales como sustancias pécticas, que posiblemente les otorgaron el carácter pastoso a los extractos.

## **7.2 Determinación del contenido de fenoles totales por el método de Folin-Ciocalteu (FC) de los extractos fenólicos**

En los EACs y EEAs se cuantificó espectrofotométricamente el contenido de fenoles totales (CFT) a través del método de Folin Ciocalteu (FC). La Tabla 10 ilustra los niveles de concentración y valores de absorbancia promedio, mientras que la Figura 4 la curva de calibrado de 5 niveles (2 a 10 µg/mL) que se construyó con ácido gálico.

**Tabla 10: Valores de absorbancia y concentración de ácido gálico para construir la curva de calibrado**

Nivel de concentración	Concentración de ácido gálico ( $\mu\text{g/mL}$ )	Unidades de Absorbancia (UA) promedio $\pm$ DE
1	2	0,0615 $\pm$ 0,1119
2	4	0,1969 $\pm$ 0,0129
3	6	0,3529 $\pm$ 0,0227
4	8	0,4622 $\pm$ 0,0205
5	10	0,5836 $\pm$ 0,0203



**Figura 4: Curva de calibrado de ácido gálico para determinar el contenido de fenoles totales**

Los valores de absorbancia obtenidos con los EACs y EEAs de cada genotipo se interpolaron en la ecuación de la recta ilustrada en la Figura 4 para obtener el CFT de cada muestra. La Tabla 11 y la Figura 5 ilustran los resultados para ambas series de extractos expresados en miligramos de equivalentes de ácido gálico por gramo de extracto seco (mg EAG / g ES).

Tabla 11: Contenido de fenoles totales de los EACs y EEAs

Genotipo	EACs	EEAs
	mg EAG / g ES	
	Promedio ± DE	Promedio ± DE
14-4	95,2 ± 6,4 <sup>a</sup>	20,3 ± 1,2 <sup>a</sup>
19-1 (2016)	102,2 ± 10,3 <sup>a</sup>	27,5 ± 1,3 <sup>b</sup>
19-1 (2017)	72,5 ± 1,4 <sup>a,c</sup>	-
19-1ha	93,4 ± 4,1 <sup>a,b,d</sup>	26,3 ± 0,1 <sup>b,c</sup>
19-2	91,3 ± 8,7 <sup>a,b,d,e</sup>	<b>32,5 ± 1,6<sup>d</sup></b>
22-1	<b>107,6 ± 7,8<sup>a,b,d,e,f</sup></b>	28,1 ± 2,9 <sup>b,c,d,e</sup>
23-2	93,9 ± 0,5 <sup>a,b,d,e,f</sup>	29,9 ± 2,0 <sup>b,c,d,e,f</sup>
27-1	69,0 ± 1,8 <sup>c,g</sup>	23,4 ± 0,4 <sup>a,b,c,e,g</sup>
31-1	86,9 ± 2,3 <sup>a,b,c,d,e,h</sup>	27,3 ± 2,4 <sup>b,c,e,f,g</sup>

EACs: Extractos acetónicos; EEAs: Extractos etanólicos ácidos; EAG: Equivalentes de ácido gálico; ES: Extracto seco; DE: Desviación estándar; En negrita el extracto más concentrado; Letras distintas representan diferencias significativas.

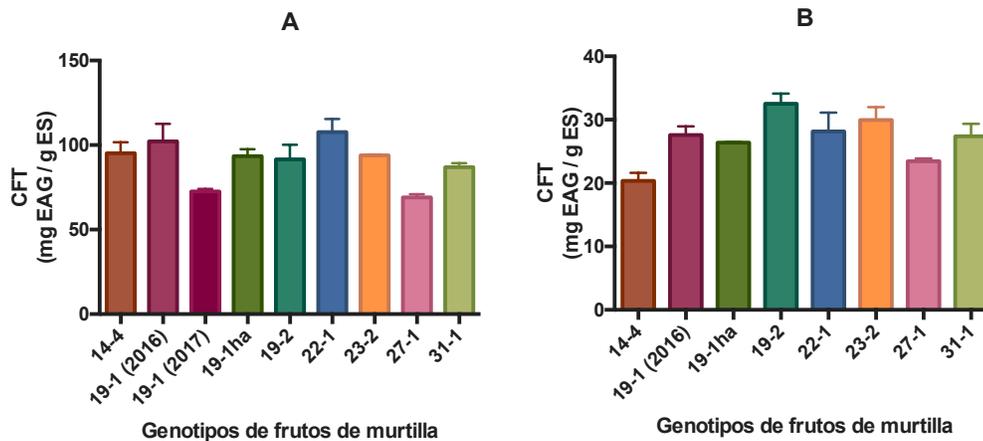


Figura 5: Contenido de fenoles totales en los EACs y EEAs

A: EACs; B: EEAs

De acuerdo con la Tabla 11 y la Figura 5 se observa que el CFT de los EACs fueron más altos que el de los EEAs (entre 3 a 5 veces) siendo estas diferencias significativas ( $p \leq 0,05$ ), lo que

evidencia una mayor extracción de derivados fenólicos con acetona. Entre los EACs los valores más altos de CFT estuvieron en los G22-1 y G19-1 (cosecha del 2016), mientras que entre los EEAs destacó el G19-2 con el mayor CFT. Al comparar las cosechas del 2016 con la del 2017 del G19-1, se puede apreciar que el EAC obtenido con los frutos cosechados el año 2017 presentó un CFT menor, aun cuando el rendimiento en peso fue mayor que el rendimiento del EAC obtenido de los frutos cosechados el año anterior. Esto podría sugerir que la extracción con acetona desde los frutos de la cosecha 2017 extrajo compuestos que no estaban presentes en los frutos de la cosecha 2016 y que no correspondían a compuestos fenólicos, diferencias que podrían deberse a factores abióticos y/o bióticos.

En la literatura se pueden encontrar reportes de CFT para frutos de murtila con el objetivo de comparar diferentes años de cosecha o distintos procesos de extracción, pero que no son comparables a los resultados obtenidos en este trabajo. Entre los trabajos destacan el de Augusto et al. (2014) que reportó 40,2 mg EAG/g ES para extractos hidroalcohólicos del G14-4 recolectado en el año 2011, el de Junqueira et al. (2015) que reportó 210 mg EAG/g peso fresco para extractos hidroalcohólicos de frutos silvestres de murtila recolectados en 2009 y el Rubilar et al. (2011) que reportó 10,1 mg EAG/g peso seco para extractos etanólicos de frutos silvestres. El CFT también varía entre los distintos órganos de una planta. En el Laboratorio de Productos Naturales (LPN) de la Universidad de Chile se analizó el CFT de extractos etanólicos de hojas de murtila para los mismos genotipos estudiados en este trabajo, reportando valores que fluctuaron entre 157,8 y 226,1 mg EAG/g ES, lo cual superó en 2 a 3 veces lo obtenido en este estudio para los extractos de frutos de murtila (Peña-Cerda et al., 2017).

### 7.3 Capacidad antioxidante

#### 7.3.1 Capacidad atrapadora de radicales DPPH

Los EACs y EEAs de los 8 genotipos en estudio fueron evaluados espectrofotométricamente respecto de su capacidad antioxidante para decolorar el radical DPPH. Como se describió en metodología, para obtener la concentración efectiva 50 (CE<sub>50</sub>) de cada extracto ensayado, se registraron las curvas de decaimiento de absorbancia para las concentraciones ensayadas, se calcularon las áreas bajo la curva (ABC) y posteriormente se construyeron los gráficos de porcentaje remanente de DPPH frente a la concentración. Estos últimos gráficos se ilustran en el Anexo 2.

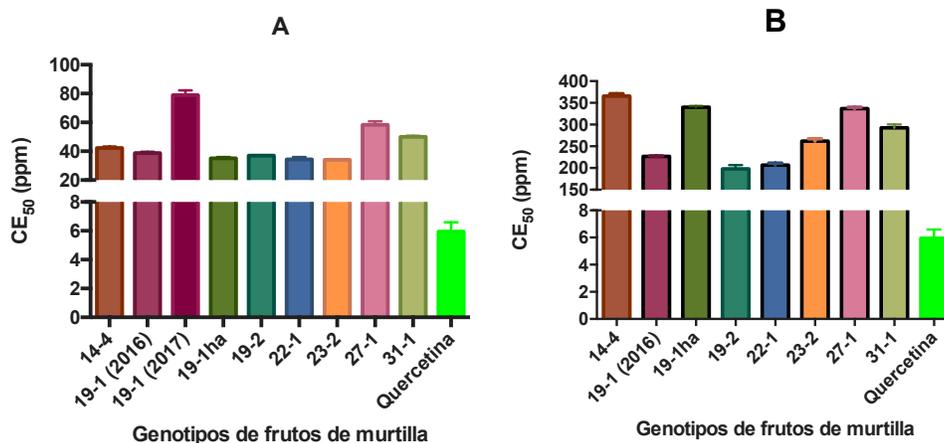
En la Tabla 12 y en la Figura 6 se resumen las CE<sub>50</sub> para los EACs y EEAs de los 8 genotipos en estudio.

**Tabla 12: Concentraciones efectivas 50 (CE<sub>50</sub>) para potencia antioxidante frente a radical DPPH de los EACs y EEAs**

Genotipo	EACs	EEAs
	CE <sub>50</sub> (ppm)	
	Promedio ± DE	Promedio ± DE
<b>14-4</b>	42,2 ± 1,7 <sup>a</sup>	365,7 ± 9,3 <sup>a</sup>
<b>19-1 (2016)</b>	38,7 ± 1,4 <sup>a,b</sup>	226,8 ± 2,0 <sup>b</sup>
<b>19-1 (2017)</b>	78,9 ± 5,8	
<b>19-1ha</b>	35,0 ± 1,6 <sup>a,b,c</sup>	339,9 ± 5,1 <sup>a,c</sup>
<b>19-2</b>	36,9 ± 0,4 <sup>a,b,c,d</sup>	<b>197,4 ± 15,6<sup>d</sup></b>
<b>22-1</b>	34,4 ± 2,6 <sup>a,b,c,d,e</sup>	206,7 ± 8,1 <sup>b,d</sup>
<b>23-2</b>	<b>34,1 ± 0,6<sup>b,c,d,e</sup></b>	261,8 ± 9,8
<b>27-1</b>	58,3 ± 4,2	336,5 ± 5,8 <sup>c</sup>
<b>31-1</b>	49,9 ± 1,1 <sup>a</sup>	292,5 ± 13,4
<b>Quercetina</b>	5,9 ± 1,0*	

\*Todos los extractos fueron estadísticamente distintos a quercetina.

EACs: Extractos acetónicos; EEAs: Extractos etanólicos ácidos; CE<sub>50</sub>: Concentración efectiva 50; ppm: partes por millón; DE: Desviación estándar; En negrita el extracto más potente; Letras distintas representan diferencias significativas.



**Figura 6: Concentraciones efectivas 50 (CE<sub>50</sub>) para potencia antioxidante frente a radical DPPH de los EACs y EEAs**

**A: EACs B: EEAs**

De acuerdo con la Tabla 12 y Figura 6 se observa que las CE<sub>50</sub> de los EACs fueron más bajas que la de los EEAs en alrededor de 6 a 11 veces, siendo estas diferencias significativas ( $p \leq 0,05$ ). Sin embargo, la potencia de ambas series de extractos fue menor que la potencia de quercetina (estándar de referencia). Entre los EACs, destacaron los G23-2 y G22-1, mientras que entre los EEAs destacó el G19-2 como los más potentes frente al radical DPPH. El EAC de la cosecha 2017 del G19-1 presentó aproximadamente la mitad de la potencia antioxidante que el EAC de la cosecha 2016 frente el radical DPPH, lo cual podría estar relacionado con la diferencia en el CFT de ambas cosechas. Otro factor que podría explicar la diferencia de potencia en la capacidad antioxidante entre los EACs de ambas cosechas es la mayor humedad residual del EAC de la cosecha 2017. En la literatura se describen sólo 2 trabajos con frutos de murtilla para analizar su capacidad antioxidante frente al radical DPPH. El primero es de Rubilar et al. (2011), quienes reportaron una CE<sub>50</sub> de 10,9 µg/mL para extractos metanólicos ácidos, valor que supera en potencia a ambas series de extractos

analizados en este trabajo. El segundo trabajo es el de Brito et al. (2014), quienes reportaron una  $CE_{50}$  de 82,9  $\mu\text{g/mL}$  para extractos hidroalcohólicos al 50 %. En ambos casos, se emplearon especímenes silvestres de murtila y los valores de potencia antioxidante fueron más bajos que los obtenidos con otras bayas que crecen comúnmente en Chile, tales como maqui (*Aristotelia chilensis*), calafate (*Berberis microphylla*), arándanos (*Vaccinium corymbosum*), arrayán (*Luma apiculata*), chequén (*Luma chequen*) y meli (*Amomyrtus meli*). Una razón para que especímenes silvestres presenten una potencia antioxidante mayor que los cultivados en el INIA bajo condiciones controladas podría ser su necesidad de adaptación a condiciones desfavorables de su hábitat, ya sea por frío extremo, mayor luminosidad y/o escases hídrica, lo cual estimula a la síntesis de compuestos fenólicos (S. Alfaro et al., 2013; Król, Amarowicz, & Weidner, 2015; López et al., 2018).

### **7.3.2 Capacidad de neutralizar los radicales del oxígeno (ORAC)**

Los frutos secos, así como los EACs y EEAs de los 8 genotipos en estudio fueron evaluados espectrofotométricamente respecto de su capacidad antioxidante a través de la metodología ORAC. Este análisis se dividió en 2 partes: Evaluación de la capacidad antioxidante total de los frutos secos y evaluación de la capacidad antioxidante de los EACs y EEAs.

Como se describió en metodología, se registraron las curvas de decaimiento de fluorescencia de la fluoresceína (FL) y de absorbancia del rojo de pirogalol (PGR), a partir de las cuales se calcularon las áreas bajo la curva (ABC). Las curvas de decaimiento de la absorbancia o de fluorescencia se ilustran en los Anexos 3, 4 y 5.

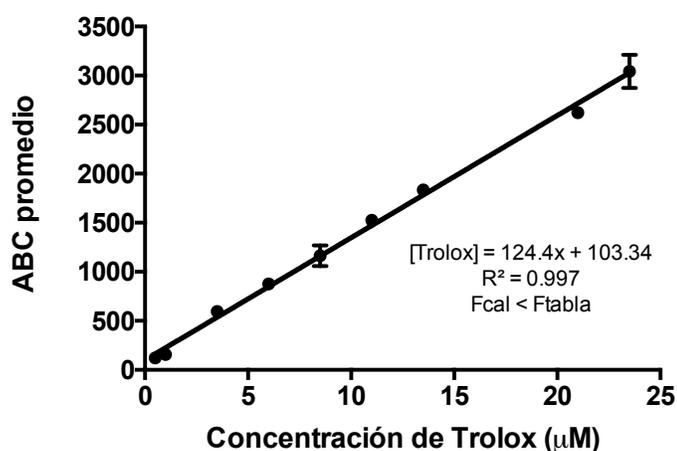
Para obtener los valores ORAC en cada modalidad, fue necesario la construcción de una curva de calibrado de trolox como sustancia de referencia. La Tabla 13 ilustra los niveles de concentración y valores de ABC promedio, mientras que la Figura 7 muestra la curva de

calibrado de 9 niveles (0,5 a 23,5  $\mu\text{M}$ ) que se construyó con trolox para la modalidad ORAC-FL.

**Tabla 13: Valores de área bajo la curva promedio y concentración de trolox para construir curva de calibrado para ORAC-FL**

Nivel de concentración	Concentración de trolox ( $\mu\text{M}$ )	ABC promedio $\pm$ DE
1	0,5	121,4 $\pm$ 61,2
2	1,0	156,5 $\pm$ 49,3
3	3,5	596,1 $\pm$ 36,7
4	6,0	876,6 $\pm$ 63,0
5	8,5	1162,7 $\pm$ 105,5
6	11,0	1525,9 $\pm$ 64,1
7	13,5	1835,0 $\pm$ 33,8
8	21,0	2622,5 $\pm$ 54,9
9	23,5	3042,4 $\pm$ 169,3

ABC: Área bajo la curva; DE: Desviación estándar



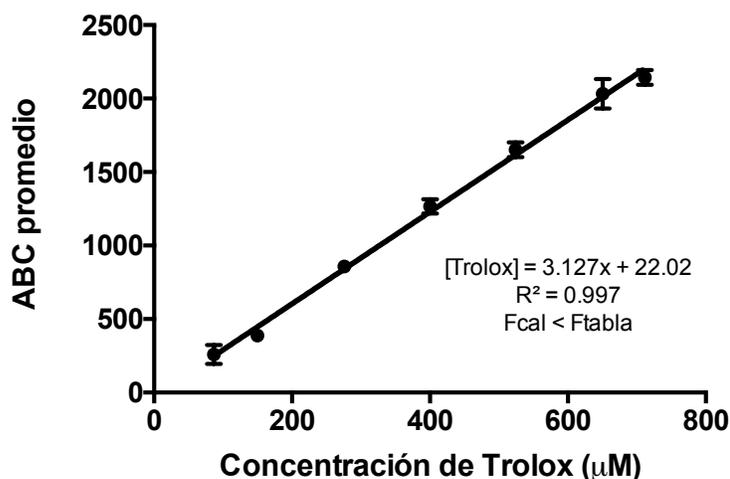
**Figura 7: Curva de calibrado de trolox para el ensayo ORAC-FL**

Por su parte, en la Tabla 14 y en la Figura 8 se ilustran los valores empleados para la construcción de la curva de calibrado para el ensayo ORAC-PGR.

**Tabla 14: Valores de área bajo la curva promedio y concentración de trolox para construir curva de calibrado para ORAC-PGR**

Nivel de concentración	Concentración de trolox ( $\mu\text{M}$ )	ABC promedio $\pm$ DE
1	86,7	259,5 $\pm$ 72,7
2	149,8	387,9 $\pm$ 27,7
3	275,9	857,2 $\pm$ 16,5
4	400,1	1266,6 $\pm$ 53,7
5	524,3	1651,0 $\pm$ 56,7
6	650,4	2032,6 $\pm$ 112,9
7	711,5	2142,9 $\pm$ 56,9

ABC: Área bajo la curva; DE: Desviación estándar



**Figura 8: Curva de calibrado de trolox para ORAC-PGR**

En las ecuaciones de la recta de ambas curvas se interpolaron las ABC corregidas de los extractos evaluados para obtener los valores de ORAC-FL y ORAC-PGR reportados a continuación.

### 7.3.2.1 Capacidad antioxidante total de frutos de los diferentes genotipos de murtila

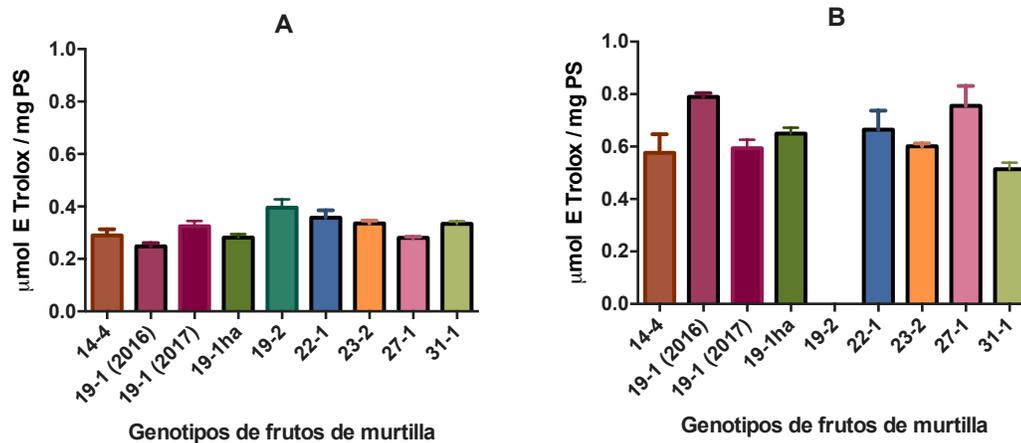
En la Tabla 15 y en la Figura 9 se ilustran los resultados de capacidad antioxidante total (CAT) para ORAC-FL y ORAC-PGR expresados en micromol de equivalentes trolox por miligramos

de peso seco de fruto ( $\mu\text{mol ET} / \text{mg PS}$ ).

**Tabla 15: Valores ORAC-FL y ORAC-PGR para determinar la capacidad antioxidante total (CAT) de frutos de murtila**

Genotipo	ORAC-FL	ORAC-PGR
	$\mu\text{mol ET} / \text{mg PS}$	
	Promedio $\pm$ DE	Promedio $\pm$ DE
14-4	$0,28 \pm 0,03^a$	$0,57 \pm 0,12^a$
19-1 (2016)	$0,24 \pm 0,01^{a,b}$	<b><math>0,78 \pm 0,02^{a,b}</math></b>
19-1 (2017)	$0,32 \pm 0,02^{a,b,c}$	$0,59 \pm 0,05^{a,b,c}$
19-1ha	$0,28 \pm 0,02^{a,b,c,d}$	$0,64 \pm 0,03^{a,b,c,d}$
19-2	<b><math>0,39 \pm 0,05^{c,e}</math></b>	n.d.
22-1	$0,35 \pm 0,04^{a,c,d,e,f}$	$0,66 \pm 0,12^{a,b,c,d,e}$
23-2	$0,33 \pm 0,01^{a,b,c,d,e,f,g}$	$0,60 \pm 0,01^{a,b,c,d,e,f}$
27-1	$0,28 \pm 0,00^{a,b,c,d,f,g,h}$	$0,75 \pm 0,13^{a,b,c,d,e,f,g}$
31-1	$0,33 \pm 0,01^{a,b,c,d,e,f,g,h}$	$0,51 \pm 0,04^{a,c,d,e,f,h}$

CAT: Capacidad antioxidante total de frutos; ET: Equivalentes trolox; PS: Peso seco de fruto; DE: Desviación estándar; n.d: No determinado; En negrita el extracto más potente; Letras distintas representan diferencias significativas.



**Figura 9: Valores ORAC-FL y ORAC-PGR para determinar la capacidad antioxidante total (CAT) de 8 genotipos de frutos de murtila.**

**A: ORAC-FL; B: ORAC-PGR**

En la Tabla 15 y la Figura 9 se aprecia que para el ensayo ORAC FL la CAT de los frutos del G19-2 presentó el valor más elevado de equivalentes trolox, sin embargo, éste no fue estadísticamente diferentes a todos los genotipos ( $p \leq 0,05$ ). Los valores de ORAC-FL de los extractos preparados con mezcla acetona : agua : ácido acético (70:29,5:0,5 v/v/v, AWA) pueden ser comparados con lo publicado en la base de datos del Instituto de Tecnología de los Alimentos (INTA) de la Universidad de Chile, quienes reportan un valor ORAC-FL para frutos de murtila silvestre igual a 0,43  $\mu\text{mol ET} / \text{mg PS}$  (<http://www.portalantioxidantes.com/>), valor que supera a los 8 genotipos de murtila estudiados en este trabajo. Respecto a las concentraciones obtenidas para cada grupo de extracto, cabe destacar el bajo valor de equivalentes de trolox en el ensayo ORAC-FL de la cosecha 2016 del extracto del G19-1, a diferencia del resto de los ensayos evaluados en este trabajo, en donde este genotipo ha destacado por sus resultados con respecto a los siete genotipos restantes. En la literatura se pueden encontrar reportes de valores ORAC-FL, pero que no pueden ser comparados con los reportados en este trabajo, debido a que la obtención de los extractos fue diferente y a que los cálculos llevados a cabo para obtener los valores ORAC fueron distintos. Por ejemplo, (Rodríguez et al., 2014) reportó para frutos silvestres de murtila valores ORAC entre 0,01 y 0,16  $\mu\text{mol ET} / \text{mg PS}$  para extractos obtenidos con mezcla metanol : agua (50:50 v/v) y mezcla acetona : agua (70:30 v/v).

Para la modalidad ORAC-PGR, destacó el extracto de la cosecha 2016 del G19-1 con el valor más alto de equivalentes trolox, sin embargo, no fue estadísticamente diferente a todos los genotipos ( $p \leq 0,05$ ). En la literatura no hay reportes de valores de equivalentes trolox para el ensayo ORAC-PGR para frutos de murtila, sin embargo, es posible encontrar trabajos con extractos de arándanos, moras y frambuesas en los cuales relacionaron que un mayor contenido de ácido ascórbico en los extractos permitió proteger mejor a la molécula sonda

(Atala, Vásquez, Speisky, Lissi, & López-Alarcón, 2009). No obstante, dado que la metodología de extracción y el cálculo del valor ORAC no coincide con lo desarrollado en este trabajo, no es posible comparar sus resultados.

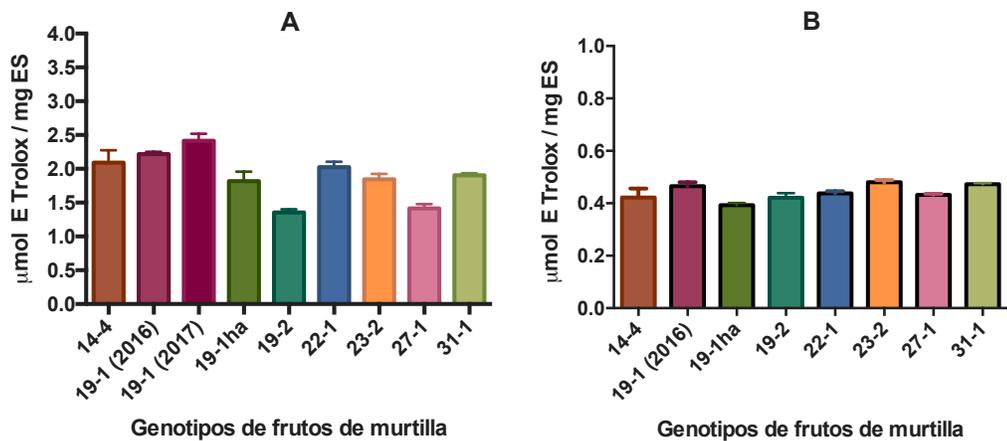
### 7.3.2.2 Capacidad antioxidante para ORAC-FL de los EACs y EEAs

La Tabla 16 y la Figura 10 exhiben los resultados del ensayo ORAC-FL de los EACs y EEAs. Estos resultados fueron expresados en micromol de equivalentes trolox por miligramos de extracto seco ( $\mu\text{mol ET / mg ES}$ ).

**Tabla 16: Valores de equivalentes de trolox para el ensayo ORAC-FL de los EACs y**

Genotipo	EEAs	
	EACs	EEAs
	$\mu\text{mol ET / mg ES}$	
	Promedio $\pm$ DE	Promedio $\pm$ DE
14-4	2,09 $\pm$ 0,31 <sup>a</sup>	0,42 $\pm$ 0,05 <sup>a</sup>
19-1 (2016)	<b>2,21 <math>\pm</math> 0,06<sup>a,b</sup></b>	0,46 $\pm$ 0,02 <sup>a,b</sup>
19-1 (2017)	2,41 $\pm$ 0,10 <sup>a,b,c</sup>	n.d.
19-1ha	1,81 $\pm$ 0,24 <sup>a,b,d</sup>	0,39 $\pm$ 0,01 <sup>a,b,c</sup>
19-2	1,35 $\pm$ 0,08 <sup>d,e</sup>	0,42 $\pm$ 0,02 <sup>a,b,c,d</sup>
22-1	2,02 $\pm$ 0,13 <sup>a,b,c,d,f</sup>	0,43 $\pm$ 0,01 <sup>a,b,c,d,e</sup>
23-2	1,84 $\pm$ 0,13 <sup>a,b,d,f,g</sup>	<b>0,48 <math>\pm</math> 0,01<sup>a,b,d,e,f</sup></b>
27-1	1,41 $\pm$ 0,11 <sup>d,e,g,h</sup>	0,43 $\pm$ 0,00 <sup>a,b,c,d,e,f,g</sup>
31-1	1,90 $\pm$ 0,05 <sup>a,b,c,d,f,g,i</sup>	0,47 $\pm$ 0,00 <sup>a,b,d,e,f,g</sup>

EACs: Extractos acetónicos; EEAs: Extractos etanólicos ácidos; ET: Equivalentes trolox; ES: Extracto seco; DE: Desviación estándar; n.d: No determinado; En negrita el extracto más potente; Letras distintas representan diferencias significativas.



**Figura 10: Valores de equivalentes trolox para el ensayo ORAC-FL de los EACs y**

**EEAs**

**A: EACs; B: EEAs**

De acuerdo con lo ilustrado en la Tabla 16 y la Figura 10 se puede apreciar que los valores de equivalentes de trolox obtenidos por los EACs superaron en 4 a 5 veces a los obtenidos por los EEAs, siendo estas diferencias significativas ( $p \leq 0,05$ ). Estos resultados podrían explicarse por el mayor CFT de los EACs respecto a los EEAs, que fueron capaces de proteger a la molécula sonda fluoresceína del ataque radicalario. Entre los EACs se destacan los resultados obtenidos para los frutos del G19-1 cosechados en el año 2016 y en el año 2017 con los mayores valores de equivalentes de trolox, mientras que entre los EEAs destacó el G23-2.

### 7.3.2.3 Capacidad antioxidante para ORAC-PGR de los EACs y EEAs

La Tabla 17 y la Figura 11 ilustran los resultados para ORAC-PGR de los EACs y EEAs expresados en micromol de equivalentes trolox por miligramos de extracto seco ( $\mu\text{mol ET / mg ES}$ ).

Tabla 17: Valores de equivalentes de trolox para el ensayo ORAC-PGR de los EACs y

Genotipo	EEAs	
	EACs	EEAs
	$\mu\text{mol ET} / 100 \text{ g ES}$	
	Promedio $\pm$ DE	Promedio $\pm$ DE
14-4	2,59 $\pm$ 0,38 <sup>a</sup>	0,45 $\pm$ 0,04 <sup>a</sup>
19-1 (2016)	<b>2,97 <math>\pm</math> 0,06<sup>a,b</sup></b>	0,28 $\pm$ 0,03 <sup>b</sup>
19-1 (2017)	1,33 $\pm$ 0,02 <sup>c</sup>	n.d.
19-1ha	3,17 $\pm$ 0,73 <sup>a,b,d</sup>	0,60 $\pm$ 0,03 <sup>c</sup>
19-2	2,09 $\pm$ 0,40 <sup>a,b,c,e</sup>	0,65 $\pm$ 0,04 <sup>c,d</sup>
22-1	2,71 $\pm$ 0,11 <sup>a,b,d,e,f</sup>	<b>0,81 <math>\pm</math> 0,00<sup>e</sup></b>
23-2	0,86 $\pm$ 0,14 <sup>c,g</sup>	0,66 $\pm$ 0,01 <sup>c,d,f</sup>
27-1	1,87 $\pm$ 0,12 <sup>a,c,e,f,h</sup>	0,43 $\pm$ 0,05 <sup>a,g</sup>
31-1	3,18 $\pm$ 0,37 <sup>a,b,d,f,i</sup>	0,76 $\pm$ 0,02 <sup>e,f,h</sup>

EACs: Extractos acetónicos; EEAs: Extractos etanólicos ácidos; ET: Equivalentes trolox; ES: Extracto seco; DE: Desviación estándar; n.d: No determinado; En negrita el extracto más potente; Letras distintas representan diferencias significativas.

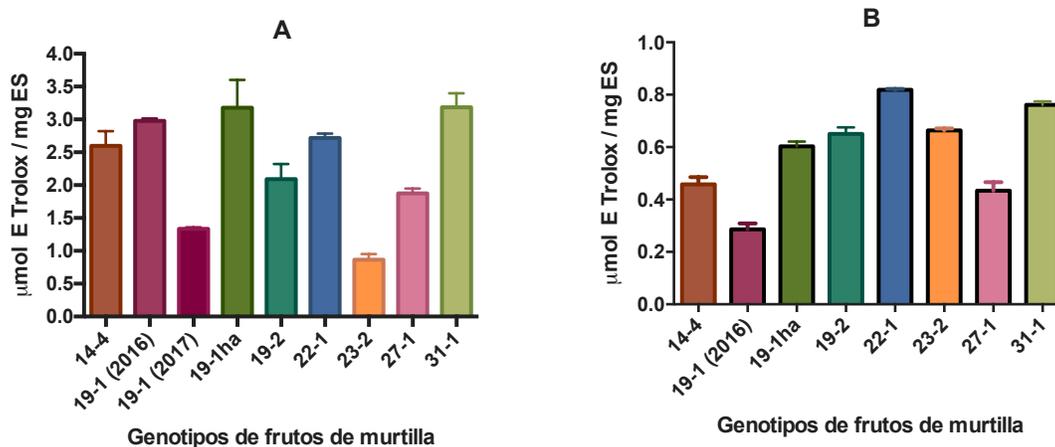


Figura 11: Valores de equivalentes trolox para el ensayo ORAC-PGR de los EACs y

EEAs

A: EACs; B: EEAs

De acuerdo a la Tabla 17 y a la Figura 11 se puede apreciar que los valores obtenidos por los EACs superaron en 3 a 10 veces a los obtenidos por los EEAs, siendo estas diferencias

significativas ( $p \leq 0,05$ ). Esto permite inferir que además de poseer una mayor CFT, los EACs presentaron compuestos químicos más reactivos para proteger a la molécula sonda rojo de pirogalol del ataque radicalario.

Entre los EACs destacaron los resultados obtenidos para los G31-1, G19-1ha y la cosecha 2016 del G19-1. Este último extracto superó en más de 2 veces al EAC obtenido con los frutos de la cosecha 2017. Por su parte, entre los EEAs, destacaron los G22-1 y G31-1 entre los valores más altos. Los genotipos con los valores más altos, así como la diferencia entre las cosechas 2016 y 2017 del G19-1 están en relación a las CFT.

En el LPN se analizaron las hojas de los mismos genotipos de murtila, reportándose valores de ORAC-FL para extractos etanólicos entre 8,6 a 23,8  $\mu\text{mol ET /mg ES}$  (Peña-Cerda et al., 2017), valores que superaron en 9 a 16 veces a lo obtenido por los frutos. Estas diferencias probablemente se deben a una mayor CFT en las hojas y a la presencia de una mezcla de triterpenos pentacíclicos que no se encuentran en los frutos (Arancibia-Radich et al., 2016; Jamkhande, Pathan, & Wadher, 2016; Liu, Rajendram, & Zhang, 2010; Montilla et al., 2003; Yamaguchi et al., 2006).

Respecto a los ensayos antioxidantes DPPH y ORAC se obtuvieron resultados dispares. Los EACs y EEAs fueron más eficientes en proteger las moléculas sondas frente al ataque de los radicales peroxilos y alcoxilos que para apagar el radical DPPH. Estas diferencias podrían ser explicadas por un mayor contenido de compuestos fenólicos en los extractos capaces de neutralizar los efectos de los radicales libres principalmente a través de transferencias de átomos de hidrógeno (HAT) que por transferencia de electrones (SET). El ensayo del radical DPPH involucra un mecanismo secuencial en que inicialmente opera el HAT y posteriormente el SET, mientras que en el ensayo ORAC predomina el mecanismo HAT (Flieger, Flieger, Baj, & Maciejewski, 2021). Por lo tanto, se puede deducir a partir de los resultados obtenidos en

este trabajo que los compuestos fenólicos presentes en frutos de murtila podrían neutralizar a los radicales libres principalmente por el mecanismo HAT.

#### 7.4 Ensayo de inhibición de la actividad de $\alpha$ -glucosidasa

Los EACs y EEAs de los ocho genotipos en estudio fueron evaluados espectrofotométricamente respecto de su potencia inhibitoria sobre la actividad de la enzima  $\alpha$ -glucosidasa, empleando acarbosa como fármaco de referencia.

Para obtener las concentraciones inhibitorias 50 ( $CI_{50}$ ) fue necesaria la construcción de curvas de inhibición en base a diferentes concentraciones de cada extracto. Estas se pueden encontrar en el Anexo 6.

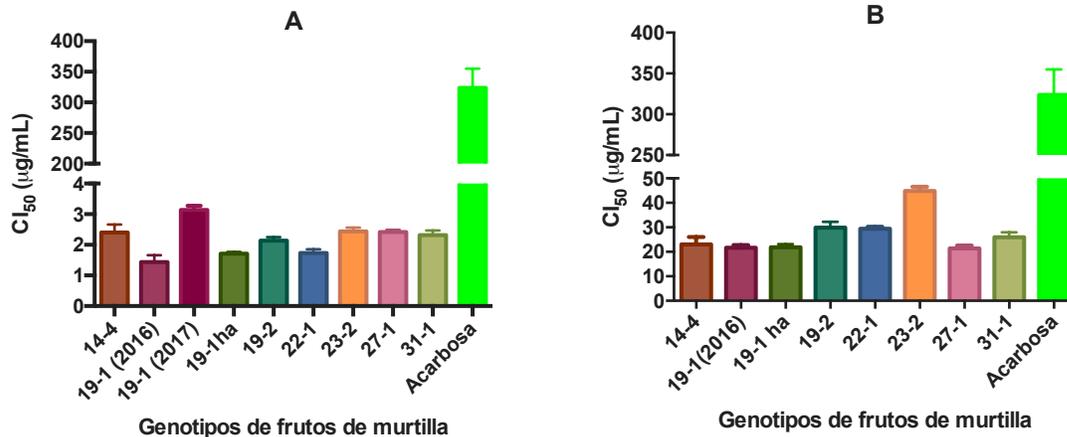
En la Tabla 18 y en la Figura 12 se ilustran los resultados de la potencia inhibitoria sobre la actividad de  $\alpha$ -glucosidasa expresados como concentración inhibitoria 50 ( $CI_{50}$ ) en  $\mu\text{g/mL}$ .

**Tabla 18: Potencia inhibitoria sobre actividad de  $\alpha$ -glucosidasa de los EACs y EEAs**

Genotipo	EACs	EEAs
	$CI_{50}$ en $\mu\text{g/mL}$	
	Promedio $\pm$ DE	
14-4	2,4 $\pm$ 0,2 <sup>a</sup>	23,0 $\pm$ 3,0 <sup>a</sup>
19-1 (2016)	1,4 $\pm$ 0,2 <sup>b</sup>	21,6 $\pm$ 1,1 <sup>a,b</sup>
19-1 (2017)	3,1 $\pm$ 0,1 <sup>c</sup>	n.d.
19-1ha	1,7 $\pm$ 0,0 <sup>b,d</sup>	21,8 $\pm$ 1,2 <sup>b,c</sup>
19-2	2,1 $\pm$ 0,1 <sup>a,d,e</sup>	29,9 $\pm$ 2,2 <sup>d</sup>
22-1	1,7 $\pm$ 0,1 <sup>b,d,e,f</sup>	29,4 $\pm$ 0,8 <sup>d,e</sup>
23-2	2,4 $\pm$ 0,1 <sup>a,e,g</sup>	44,8 $\pm$ 1,7 <sup>f</sup>
27-1	2,4 $\pm$ 0,0 <sup>a,e,g,h</sup>	<b>21,4 <math>\pm</math> 1,1<sup>a,b,c,g</sup></b>
31-1	2,3 $\pm$ 0,1 <sup>a,e,g,h</sup>	26,0 $\pm$ 2,0 <sup>a,b,c,d,e,g,h</sup>
<b>Acarbosa</b>	<b>323,7 <math>\pm</math> 31,2*</b>	

\*Todos los extractos fueron estadísticamente distintos a acarbosa.

EACs: Extractos acetónicos; EEAs: Extractos etanólicos ácidos;  $CI_{50}$ : Concentración inhibitoria 50; DE: Desviación estándar; n.d: No determinado; En negrita el extracto más potente; Letras distintas representan diferencias significativas.



**Figura 12: Potencia inhibitoria sobre actividad de  $\alpha$ -glucosidasa de los EACs y EEAs**

**A: EACs; B: EEAs**

De acuerdo con la Tabla 18 y la Figura 12 se aprecia que los EACs fueron alrededor de 160 veces más potentes que la acarbosa, mientras que los EEAs fueron alrededor de 12 veces más potentes que el fármaco de referencia. Entre los EACs destacó el G19-1 como el más potente, mientras que entre los EEAs destacó el G27-1, sin embargo, estos no fueron estadísticamente diferentes a todos los genotipos ( $p \leq 0,05$ ). Cabe destacar que el EAC del G19-1 proveniente de frutos cosechados el 2016 superó en más de 2 veces la potencia inhibitoria sobre la actividad de la  $\alpha$ -glucosidasa respecto del EAC de la cosecha 2017, lo cual puede explicarse por el mayor CFT de la cosecha 2016 por sobre la 2017 y la relevancia que tienen los compuestos fenólicos en la inhibición de la actividad enzimática. Al comparar ambas series de extractos, la potencia inhibitoria de los EACs superó en alrededor de 20 veces a los EEAs, lo cual no se relaciona directamente con la diferencia en los CFT de ambas series, ya que los EACs exhibieron una CFT entre 3 a 5 veces más alta que los EEAs. Esta diferencia podría explicarse en que las mezclas particulares de compuestos fenólicos de los EACs fueron más eficientes para inhibir la actividad enzimática con respecto a los polifenoles contenidos en los EEAs.

En la literatura se puede encontrar un trabajo que reportó una  $CI_{50}$  de 69,2  $\mu\text{g/mL}$  para un extracto etanólico de frutos silvestres de murtila (Rubilar et al., 2011), siendo dicho extracto menos potente que ambas series de extractos de los genotipos estudiados en este trabajo.

### 7.5 Ensayo de inhibición de la actividad de glicógeno fosforilasa a (GPa)

Los EACs y los EEAs de los 8 genotipos en estudio fueron evaluados espectrofotométricamente respecto de su potencia inhibitoria sobre la actividad de la enzima glicógeno fosforilasa a (GPa), empleando cafeína como fármaco de referencia.

Para obtener las concentraciones inhibitorias 50 ( $CI_{50}$ ) fue necesaria la construcción de curvas de inhibición de la actividad de la GPa en base a diferentes concentraciones de cada extracto, las cuales se ilustran en el Anexo 7.

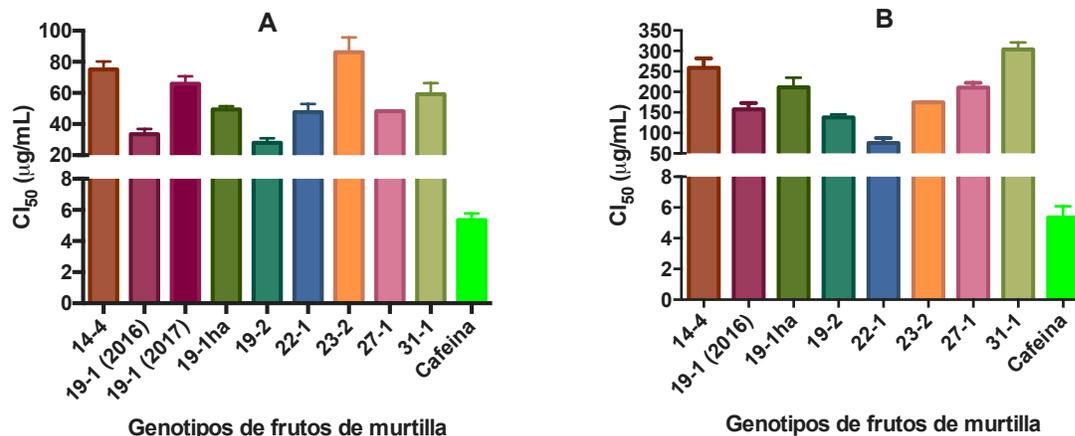
En la Tabla 19 y en la Figura 13 se ilustran los resultados de potencia inhibitoria sobre GPa expresados como concentración inhibitoria 50 ( $CI_{50}$ ) en  $\mu\text{g/mL}$ .

**Tabla 19: Potencia inhibitoria sobre actividad de GPa de los EACs y EEAs**

Genotipo	EACs	EEAs
	$CI_{50}$ en $\mu\text{g/mL}$	
	Promedio $\pm$ DE	
<b>14-4</b>	75,1 $\pm$ 8,8 <sup>a</sup>	259,1 $\pm$ 22,8 <sup>a</sup>
<b>19-1 (2016)</b>	33,4 $\pm$ 5,8 <sup>b</sup>	157,7 $\pm$ 15,3 <sup>b</sup>
<b>19-1 (2017)</b>	65,8 $\pm$ 8,5 <sup>a,c</sup>	n.d.
<b>19-1ha</b>	49,4 $\pm$ 3,3 <sup>a,b,c,d</sup>	211,2 $\pm$ 23,7 <sup>c</sup>
<b>19-2</b>	<b>27,9 <math>\pm</math> 5,1<sup>b,d,e</sup></b>	137,8 $\pm$ 6,9 <sup>b,d</sup>
<b>22-1</b>	47,6 $\pm$ 9,1 <sup>b,c,d,e,f</sup>	<b>75,3 <math>\pm</math> 12,1<sup>e</sup></b>
<b>23-2</b>	86,1 $\pm$ 16,4 <sup>a,c,g</sup>	174,3 $\pm$ 0,7 <sup>b,c,d,f</sup>
<b>27-1</b>	48,1 $\pm$ 0,2 <sup>a,b,c,d,e,f,h</sup>	210,5 $\pm$ 11,8 <sup>c,f,g</sup>
<b>31-1</b>	59,2 $\pm$ 12,3 <sup>a,b,c,d,f,h</sup>	303,7 $\pm$ 17,1 <sup>h</sup>
<b>Cafeína</b>	5,3 $\pm$ 0,7 <sup>*</sup>	

\*Todos los extractos fueron estadísticamente distintos a cafeína.

EACs: Extracto acetónico; EEA: Extracto etanólico ácido;  $CI_{50}$ : Concentración inhibitoria 50; DE: Desviación estándar; n.d: No determinado; En negrita el extracto más potente; Letras distintas representan diferencias significativas.



**Figura 13: Potencia inhibitoria sobre actividad de GPa de los EACs y EEAs**

**A: EACs; B: EEAs**

De la Tabla 19 y Figura 13 se desprende que ambas series de extractos fueron capaces de inhibir la actividad enzimática de la GPa, sin embargo, los EACs fueron entre 5 a 16 veces menos potentes que la cafeína y los EEAs fueron entre 14 y 57 veces menos potentes que el fármaco de referencia. Entre los EACs, el G19-1 de la cosecha 2016 y el G19-2 presentaron las más bajas CI<sub>50</sub>, mientras que entre los EEAs el G22-1 destacó con la menor CI<sub>50</sub>, sin embargo, estos no fueron estadísticamente diferentes a todos los genotipos ( $p \leq 0,05$ ). Al comparar las cosechas 2016 y 2017 de los EACs del G19-1 se repite la tendencia de que la cosecha 2016 fue alrededor de 2 veces más potente que la cosecha 2017. Entre ambas series de extractos, los EACs superaron entre 3 y 9 veces a los EEAs, lo que como se mencionó anteriormente, podría estar relacionado con la diferencia entre las CFT de ambas series y las mezclas particulares de polifenoles obtenidos con acetona y con mezcla etanol ácido. Cabe destacar que en la literatura no hay reportes de potencia inhibitoria sobre la GPa de frutos de murtillo.

## **7.6 Caracterización química de compuestos fenólicos presentes en los extractos ricos en fenoles mediante CLAE-UV-ESI-MS**

En función de que la serie de los EACs presentó un mayor potencia en los ensayos farmacológicos *in vitro*, se definió analizar su perfil fenólico a través de CLAE acoplado a detector de espectrometría de masas. En el Anexo 1 se ilustran las 146 señales analizadas, con la identificación tentativa de acuerdo con la literatura y a diferentes bases de datos, así como se muestran también los resultados del análisis semicuantitativo con la concentración relativa de cada compuesto.

Se puede señalar que los perfiles de compuestos fenólicos de los EACs fueron similares entre los 8 genotipos analizados, destacando la identificación tentativa de derivados de flavonoides como quercetina, miricetina, luteolina y canferol, taninos elágicos, así como derivados de los ácidos gálico, cafeico y quínico. En el LPN se publicó recientemente un artículo que reportó el perfil fenólico de 5 EEAs obtenidos desde los frutos de los G14-4, G19-1, G19-1ha, G23-2 y G27-1, a partir del cual se puede evidenciar que la identificación tentativa de compuestos fue similar a lo encontrado en los EACs (Pérez-Arancibia et al., 2021).

Los compuestos químicos identificados tentativamente en los EACs están en relación a lo descrito para frutos de murtila silvestre en la literatura, describiéndose la presencia de ácidos fenólicos, diferentes flavanoles, flavonas, flavan-3-oles, tales como 3-O-glucósidos del ácido caféico, 3-O-glucósidos de quercetina, quercetina y otros compuestos minoritarios como ácido gálico, rutina, quercitrina, luteolina, canferol, 3-O-glucósido de canferol, ácido p-cumárico y miricetina (Junqueira-Gonçalves et al., 2015; López et al., 2018).

Cabe destacar que en los EACs se identificaron tentativamente compuestos no descritos en la literatura para los frutos de murtila, tales como isoramnetina, taxifolina y derivados de epicatequina, por lo que los resultados obtenidos en este trabajo contribuyen al conocimiento

de la composición química de los frutos de esta especie autóctona. En relación a las cosechas 2016 y 2017 de los frutos del G19-1 se evidencian diferencias en su perfil fitoquímico, destacando que el contenido fenólico de la cosecha 2016 fue muy variado en derivados de ácidos fenólicos y compuestos de tipo flavonoide, mientras que en la cosecha 2017 se evidenció mayormente la presencia de derivados de ácido gálico, catequina y epicatequina, y en menor medida la presencia de algunos compuestos de tipo flavonoide.

### **7.7 Selección del extracto para ser evaluado en un modelo *in vivo* de DMT2**

A partir de los resultados anteriores se seleccionó un extracto para ser evaluado en el estudio *in vivo* en ratones de la cepa BKS.Cg- $m^{+/+}$ Lepr<sup>db</sup>/J que representan un modelo de DMT2.

Para tales efectos, se organizaron los extractos en función de los resultados obtenidos para los ensayos farmacológicos *in vitro*.

Considerando que i) los EAC obtuvieron mejores resultados que los EEAs, ii) no hubo un único genotipo que se destacara por sobre los demás y iii) que para algunos de los ensayos el análisis estadístico evidenció que no existieron diferencias significativas entre el valor más destacado y el resto de los genotipos, se ingresaron los resultados, sin incluir su variabilidad, a la Tabla 20.

**Tabla 20: Criterios de selección del EAC para ser evaluado en un modelo *in vivo* de DMT2**

Posición	Cantidad disponible de extracto (g)		Fenoles totales (mg EAG/ g ES)		DPPH CE <sub>50</sub> (ppm)		ORAC FL (μmol ET / g ES)		α-glucosidasa Cl <sub>50</sub> (μg/mL)		GPa Cl <sub>50</sub> (μg/mL)	
1	14-4	6,10	22-1	107,6	23-2	34,1	19-1	2,21	19-1	1,43	19-2	27,9
2	19-2	5,59	19-1	102,2	22-1	34,4	14-4	2,09	19-1ha	1,71	19-1	33,5
3	27-1	4,13	14-4	95,2	19-1ha	35,0	22-1	2,02	22-1	1,73	22-1	47,7
4	23-2	3,28	23-2	93,9	19-2	36,9	31-1	1,90	19-2	2,14	27-1	48,2
5	31-1	2,62	19-1ha	93,4	19-1	38,7	23-2	1,84	31-1	2,32	19-1ha	49,5
6	19-1ha	2,54	19-2	91,3	14-4	42,2	19-1ha	1,81	14-4	2,40	31-1	59,2
7	22-1	2,50	31-1	86,9	31-1	49,9	27-1	1,41	27-1	2,42	14-4	75,1
8	19-1	2,42	27-1	69,0	27-1	58,3	19-2	1,35	23-2	2,44	23-2	86,1

De acuerdo con la Tabla 20 se puede apreciar que uno de los genotipos, marcado en rojo (G19-1 de cosecha 2016), se repitió en los primeros lugares de cada ensayo, excepto en el ensayo de apagamiento del radical DPPH y en la cantidad de extracto disponible, donde obtuvo el menor rendimiento en peso de todos.

Por este motivo, el G19-1, variedad registrada por INIA como perla roja (Red Pearl INIA), fue seleccionado para llevar a cabo el estudio *in vivo* en el Centro de Medicina Regenerativa (CMR) de la Facultad de Medicina de la Universidad del Desarrollo (UDD). Cabe destacar que, al momento de llevar a cabo esta selección, sólo se había analizado la cosecha 2016 del G19-1. El análisis químico y la evaluación del potencial farmacológico *in vitro* de la cosecha 2017 se llevó a cabo cuando el ensayo *in vivo* estaba en desarrollo y se había comenzado a administrar el extracto de la cosecha 2016 a los animales obesos diabéticos.

## 7.8 Ensayo *in vivo* en ratones obesos diabéticos

Los animales ingresaron al estudio con una edad de entre 6 y 11 semanas de vida. A medida que fueron naciendo animales obesos diabéticos, estos se asignaron a los diferentes grupos de estudio, aumentando el n de cada grupo en un periodo de 7 de meses de trabajo. Cuando hubo disponibilidad de varios animales obesos en un mismo periodo, estos se dividieron en función de su nivel de obesidad y de hiperglicemia.

Una vez finalizado el estudio, los grupos quedaron distribuidos como sigue:

**Grupo 1**, control sano (Sin tratamiento): 8 animales

**Grupo 2**, control positivo (300 mg/Kg de metformina): 7 animales

**Grupo 3**, tratado (200 mg/Kg de EAC G19-1): 8 animales

**Grupo 4**, control negativo (Agua MilliQ): 5 animales

Los resultados obtenidos para los diferentes parámetros de control metabólico consideraron las mediciones de 3 días antes de iniciar el estudio y los 10 de aplicación de los diferentes tratamientos. Los resultados se presentan en tablas y en gráficos. Para estos últimos, los grupos se identifican con los colores verde para grupo control sano, negro para grupo control positivo tratado con metformina, rojo para grupo tratado con el EAC G19-1 y azul para el grupo control negativo tratado con agua.

Cabe destacar que el grupo tratado con el extracto de frutos de murtila incluyó 2 cosechas del G19-1, del año 2016 y 2017, tal como se ilustró para resultados anteriores de ensayos *in vitro*. El uso de 2 cosechas se debió a la poca cantidad disponible de extracto de la cosecha 2016, la cual fue empleada para los ensayos farmacológicos *in vitro* de 2 trabajos de tesis doctoral y no fue suficiente para completar el tratamiento con los animales. De los 8 animales tratados con extracto, 3 fueron tratados con cosecha 2016 y 5 con cosecha 2017.

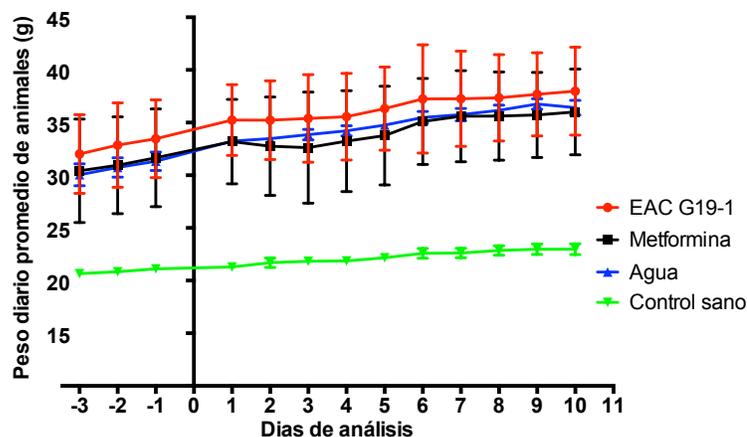
### 7.8.1 Evaluación del efecto de la administración del extracto sobre la ganancia de peso corporal

En la Tabla 21 y en la Figura 14 se ilustran los resultados de peso de los animales durante todo el periodo de estudio.

**Tabla 21: Registro de peso (g) diario promedio de animales en estudio por grupo de tratamiento**

Día de análisis	Grupo Control Sano	Grupo Control Positivo	Grupo Tratado	Grupo Control Negativo
	Sin Tratamiento	Metformina	EAC G19-1	Agua MilliQ
Promedio ± SEM (g)				
-3	20,6 ± 0,4	30,4 ± 1,8	32,0 ± 1,3	30,0 ± 1,0
-2	20,8 ± 0,4	30,9 ± 1,7	32,8 ± 1,4	30,7 ± 0,9
-1	21,1 ± 0,4	31,6 ± 1,7	33,4 ± 1,3	31,3 ± 0,8
1	21,3 ± 0,4	33,2 ± 1,5	35,2 ± 1,1	33,2 ± 0,4
2	21,7 ± 0,4	32,7 ± 1,7	35,2 ± 1,3	33,4 ± 0,4
3	21,8 ± 0,4	32,6 ± 1,9	35,4 ± 1,4	33,8 ± 0,5
4	21,8 ± 0,4	33,2 ± 1,8	35,5 ± 1,4	34,2 ± 0,4
5	22,1 ± 0,4	33,7 ± 1,7	36,3 ± 1,4	34,7 ± 0,4
6	22,5 ± 0,4	35,1 ± 1,5	37,2 ± 1,8	35,4 ± 0,5
7	22,6 ± 0,4	35,6 ± 1,6	37,2 ± 1,6	35,7 ± 0,5
8	22,8 ± 0,4	35,6 ± 1,5	37,3 ± 1,4	36,1 ± 0,5
9	22,9 ± 0,5	35,7 ± 1,5	37,6 ± 1,3	36,7 ± 0,5
10	22,9 ± 0,5	36,0 ± 1,5	37,9 ± 1,4	36,4 ± 0,6

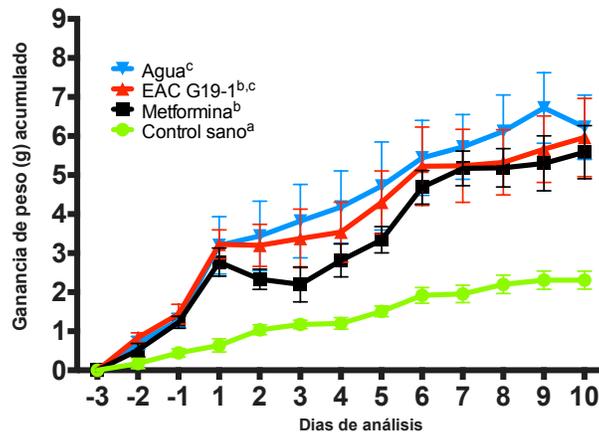
SEM: Error estándar de la media



**Figura 14: Peso (g) diario promedio de animales en estudio por grupo de tratamiento**

En la Tabla 21 y la Figura 14 se puede apreciar las curvas crecientes que evidencian ganancia de peso diario en todos los grupos. Salvo el grupo control sano, los grupos tratados no evidencian diferencias significativas en su tendencia al alza de peso corporal.

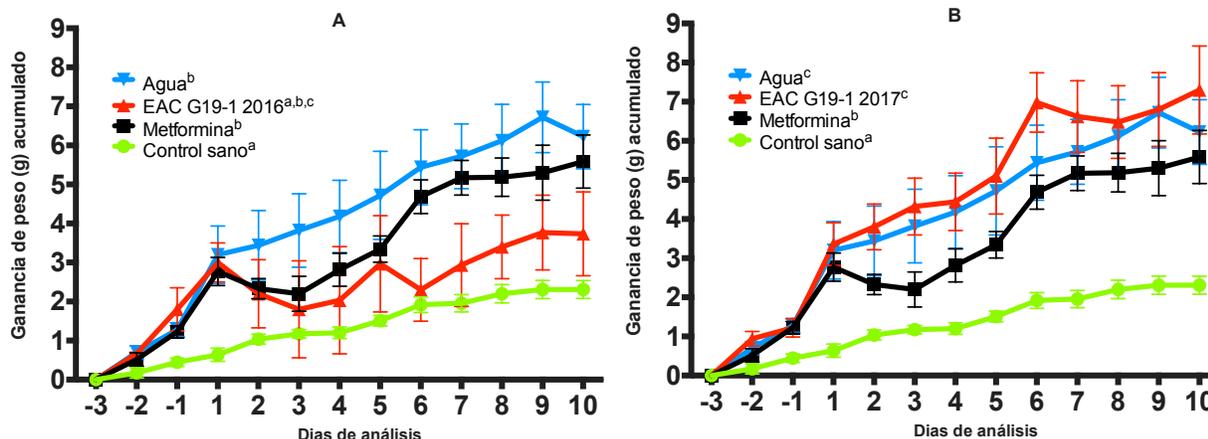
Este análisis se puede llevar a cabo considerando la ganancia de peso acumulada desde el primer día de control, por cada grupo tratado, tal como se evidencia en la Figura 15.



\*Letras distintas representan diferencias significativas entre cada grupo a lo largo del estudio.

**Figura 15: Ganancia de peso (g) acumulado de animales en estudio por grupo de tratamiento**

La Figura 15 evidencia que los grupos tratados subieron de peso sin mayores diferencias. Se puede identificar que el grupo tratado con metformina tuvo un alza menor cuando recién se inicio el tratamiento, entre los días 1 y 5, tendencia que se perdió en la segunda semana de ensayo. Sin embargo, en relación al grupo tratado con los EACs del G19-1, si se separan los animales en relación al año de cosecha administrado, los gráficos evidencian diferencias, tal como se ilustra en la Figura 16.



\*Letras distintas representan diferencias significativas entre cada grupo a lo largo del estudio.

**Figura 16: Ganancia de peso (g) acumulado de animales en estudio por grupo de tratamiento, separados por año de cosecha para el EAC G19-1**

**A: Cosecha 2016; B: Cosecha 2017**

Al separar por años de cosecha, se puede evidenciar una menor ganancia de peso en el grupo que fue tratado con el EAC G19-1 cosecha 2016 (n= 3), diferencia que fue significativa ( $p \leq 0,05$ ) comparada con el grupo control negativo y no significativa comparada con el grupo tratado con metformina y con el grupo control sano. Este efecto puede estar relacionado con los resultados obtenidos para los ensayos *in vitro*, en que la cosecha 2016 fue claramente superior a la 2017 y a las diferencias en el perfil fenólico evidenciado en el análisis químico. Para los animales tratados con esta última cosecha (n= 5) se aprecia incluso una tendencia a ganar más peso que el grupo tratado con metformina y que el grupo control negativo, aun cuando no existieron diferencias significativas ( $p \leq 0,05$ ) con el grupo tratado con agua. Sin embargo, el bajo número de animales tratados con la cosecha 2016 no permite asegurar que el efecto observado se deba necesariamente al extracto de frutos de murtilla, ya que se sería preciso aumentar el n y prolongar los días de tratamiento.

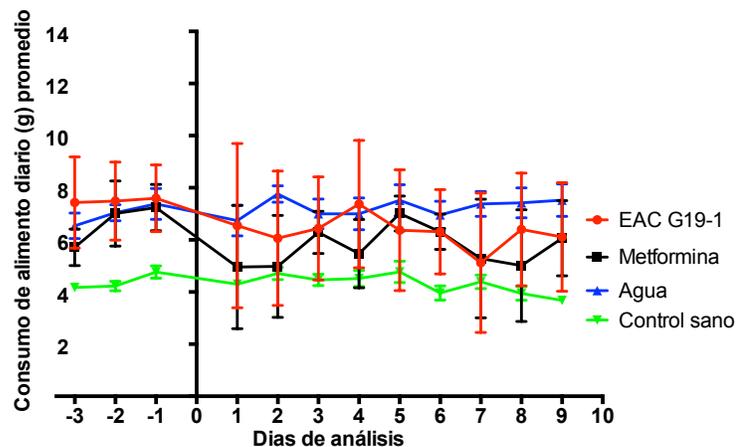
### 7.8.2 Evaluación del efecto de la administración del extracto sobre el consumo de alimento diario

En la Tabla 22 y en la Figura 17 se ilustran los resultados para consumo de alimento diario en los diferentes grupos tratados durante todo el periodo de estudio.

**Tabla 22: Consumo de alimento diario promedio de animales en estudio por grupo de tratamiento**

Día de análisis	Grupo Control Sano	Grupo Control Positivo	Grupo Tratado	Grupo Control Negativo
	Sin Tratamiento	Metformina	EAC G19-1	Agua MilliQ
<b>Promedio ± SEM (g)</b>				
-3	4,1 ± 0,1	5,7 ± 0,2	7,4 ± 0,6	6,5 ± 0,4
-2	4,2 ± 0,1	7,0 ± 0,4	7,4 ± 0,5	7,0 ± 0,3
-1	4,7 ± 0,2	7,2 ± 0,3	7,6 ± 0,4	7,3 ± 0,5
1	4,3 ± 0,1	4,9 ± 0,8	6,5 ± 1,1	6,7 ± 0,5
2	4,7 ± 0,2	4,9 ± 0,7	6,0 ± 0,9	7,7 ± 0,3
3	4,4 ± 0,2	6,2 ± 0,3	6,4 ± 0,6	7,0 ± 0,5
4	4,5 ± 0,3	5,4 ± 0,4	7,3 ± 0,8	7,0 ± 0,6
5	4,7 ± 0,4	7,0 ± 0,2	6,3 ± 0,8	7,5 ± 0,5
6	3,9 ± 0,2	6,3 ± 0,2	6,3 ± 0,5	6,9 ± 0,5
7	4,3 ± 0,2	5,2 ± 0,8	5,1 ± 0,9	7,3 ± 0,4
8	3,9 ± 0,2	5,0 ± 0,8	6,4 ± 0,7	7,4 ± 0,5
9	3,6 ± 0,1	6,0 ± 0,5	6,1 ± 0,7	7,5 ± 0,6

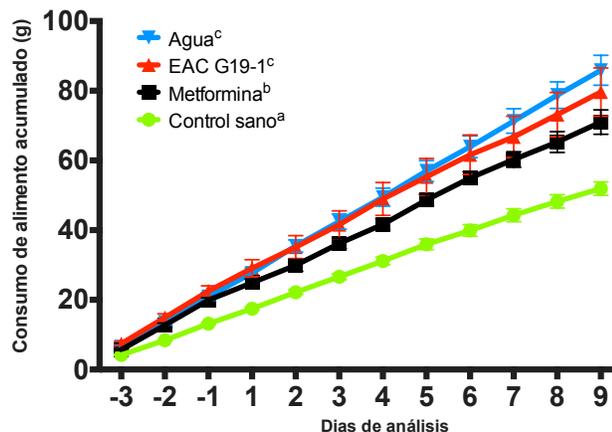
SEM: Error estándar de la media



**Figura 17: Consumo de alimento (g) diario promedio de animales en estudio por grupo de tratamiento**

A partir de la Tabla 22 y la Figura 17 se puede apreciar que no hubo cambios en el consumo de alimento en los grupos ensayados. Esto evidencia que la administración de los tratamientos a través de la sonda gástrica no afectó el desarrollo del ensayo y que la variabilidad observada se debe a las diferencias inherentes a cada animal en su consumo de alimento.

Este análisis se puede llevar a cabo considerando el consumo acumulado de alimento desde el primer día de control, por cada grupo tratado, tal como se evidencia en la Figura 18.

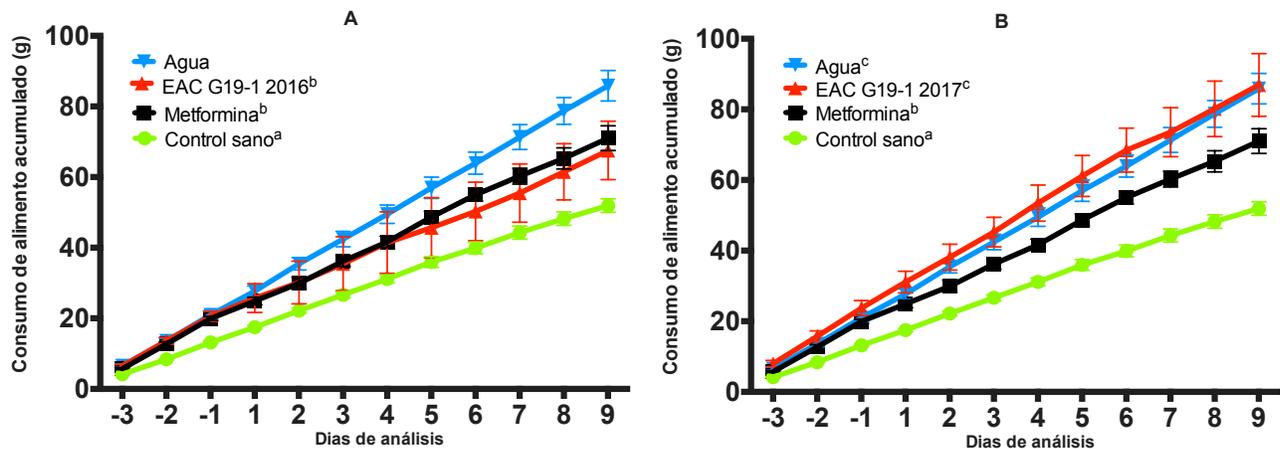


\*Letras distintas representan diferencias significativas entre cada grupo a lo largo del estudio.

**Figura 18: Consumo de alimento acumulado de animales en estudio por grupo de tratamiento**

La Figura 18 evidencia que los grupos tratados presentaron diferencias significativas ( $p \leq 0,05$ ) en cuanto al consumo de alimento acumulado respecto al grupo control sano, es decir el grupo de ratones no obesos. Se puede apreciar que el grupo tratado con metformina presentó un consumo acumulado estadísticamente menor a los animales tratados con extracto y los tratados con agua. En relación al grupo tratado con los EACs G19-1, el consumo acumulado no fue estadísticamente diferente al grupo control negativo. Sin embargo, si se separan los

animales en relación al año de cosecha los gráficos evidencian diferencias, tal como se ilustra en la Figura 19.



\*Letras distintas representan diferencias significativas entre cada grupo a lo largo del estudio.

**Figura 19: Consumo de alimento acumulado de animales en estudio por grupo de tratamiento, separados por año de cosecha para el EAC G19-1**

**A: Cosecha 2016; B: Cosecha 2017**

Se puede evidenciar que los 3 ratones tratados con la cosecha 2016 no presentaron diferencias significativas en el consumo acumulado de alimento respecto al grupo control positivo, efecto que no se aprecia en los 5 ratones tratados con la cosecha 2017. En los animales que recibieron cosecha 2017 el consumo acumulado de alimento no presentó diferencias significativas respecto al grupo control negativo.

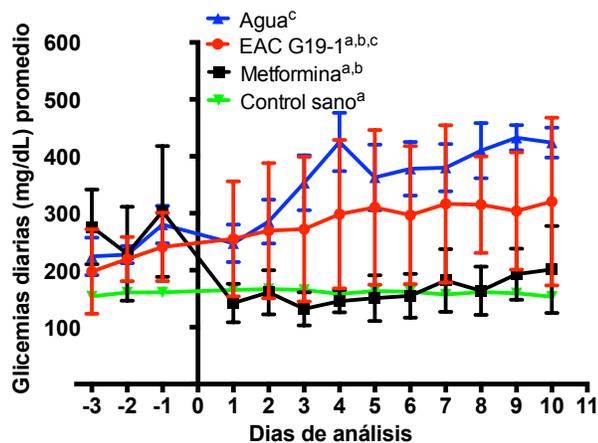
### 7.8.3 Evaluación del efecto de la administración del extracto sobre las glicemias diarias

En la Tabla 23 y en la Figura 20 se ilustran los resultados promedio por grupo de tratamiento para el control diario de los niveles de azúcar en sangre durante el periodo de estudio.

**Tabla 23: Control de glicemias diarias promedio de animales en estudio por grupo de tratamiento**

Día de análisis	Grupo Control Sano	Grupo Control Positivo	Grupo Tratado	Grupo Control Negativo
	Sin Tratamiento	Metformina	EAC G19-1	Agua MilliQ
<b>Promedio ± SEM (mg/dL)</b>				
-3	154 ± 3	276 ± 24	197 ± 26	224 ± 33
-2	161 ± 3	229 ± 31	219 ± 13	227 ± 15
-1	161 ± 6	303 ± 43	241 ± 21	280 ± 32
1	165 ± 3	142 ± 12	255 ± 35	247 ± 32
2	167 ± 4	161 ± 15	269 ± 41	285 ± 38
3	165 ± 5	132 ± 11	272 ± 44	353 ± 48
4	158 ± 2	145 ± 7	298 ± 46	425 ± 51
5	163 ± 3	151 ± 15	310 ± 48	363 ± 57
6	162 ± 3	155 ± 14	296 ± 42	378 ± 46
7	157 ± 3	181 ± 20	316 ± 48	380 ± 41
8	161 ± 4	164 ± 16	315 ± 29	410 ± 48
9	159 ± 5	193 ± 16	303 ± 36	432 ± 22
10	153 ± 3	201 ± 31	320 ± 55	424 ± 26

SEM: Error estándar de la media



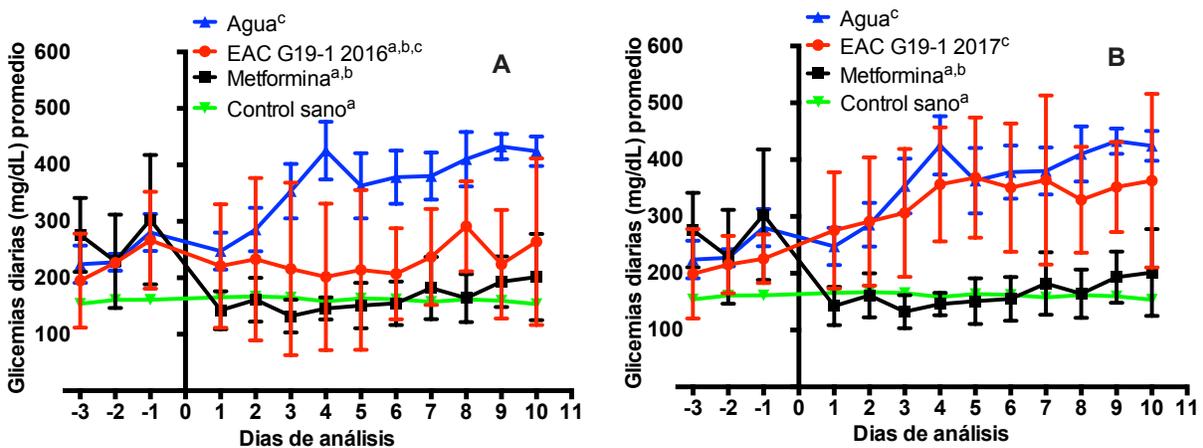
\*Letras distintas representan diferencias significativas entre cada grupo a lo largo del estudio.

**Figura 20: Variación de glicemias diarias de animales en estudio por grupo de tratamiento**

La Tabla 23 y la Figura 20 evidencian la amplia variabilidad obtenida en el grupo de animales tratados con los EACs G19-1. Además, es posible apreciar que el grupo control negativo y el

grupo tratado con extracto mantuvieron sus glicemias elevadas durante todo el período de estudio, a diferencia del grupo control positivo tratado con metformina, que antes del inicio del tratamiento presentó glicemias por sobre los 200 mg/dL y que luego de iniciado el tratamiento disminuyó los niveles de azúcar en sangre al nivel de los animales control sano, quienes se mantuvieron sin variar durante todo el periodo de estudio, lo que permite validar el modelo, ya que los animales respondieron al fármaco hipoglicemiante.

Tal como se han ilustrado los resultados para los parámetros de control metabólico anteriores, si se separa el grupo tratado con extracto en las 2 cosechas empleadas, se pueden apreciar diferencias tal como se evidencia en la Figura 21.



\*Letras distintas representan diferencias significativas entre cada grupo a lo largo del estudio.

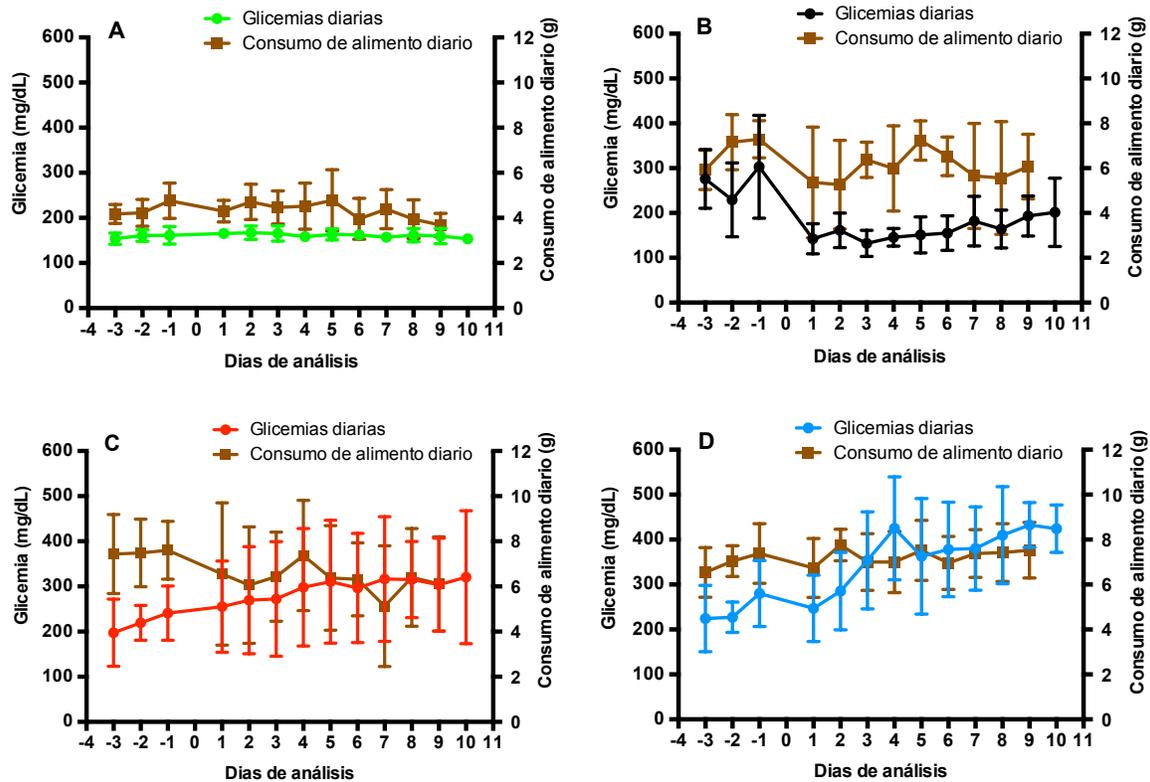
**Figura 21: Variación de glicemias diarias de animales en estudio por grupo de tratamiento, separados por año de cosecha para el EAC 19-1**

**A: Cosecha 2016; B: Cosecha 2017**

La Figura 21 evidencia que entre ambas cosechas hubo una tendencia distinta, sin embargo, la alta variabilidad en los valores de glicemia en cada día de análisis no permite determinar que hubo diferencias significativas entre la cosecha 2016 y 2017.

Para descartar que las variaciones en las glicemias obtenidas durante el estudio pudieran

estar asociadas a variaciones en el consumo de alimento diario, se separaron los valores de glicemias y consumo de alimento por grupos y se construyeron gráficos pareados, los cuales se ilustran en la Figura 22.



**Figura 22: Variación de glicemias promedio diarias versus consumo de alimento promedio diario de animales en estudio por grupo de tratamiento.**

**A: Control sano; B: Metformina; C: EAC G19-1; D: Agua**

Al contrastar el consumo de alimento diario versus la variación de los valores de glicemias diarias en cada grupo, no se aprecia una influencia del alimento ingerido en los niveles de azúcar en sangre, por lo que las diferencias en los valores de glicemia debieran estar asociados a los diferentes tratamientos que recibieron los animales.

### 7.8.4 Evaluación de la función pancreática de los animales a través de un Test de Tolerancia Oral a la Glucosa (TTOG)

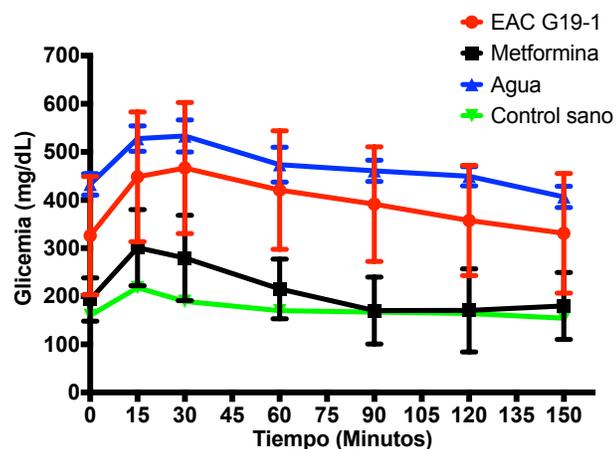
Para evaluar la función pancreática de los animales en estudio, en cuanto a la liberación y síntesis de insulina, se aplicó un TTOG el penúltimo día de estudio, administrando una carga de glucosa por vía oral, a través de sonda gástrica, tal como se aplicaron los tratamientos.

En la Tabla 24 y en la Figura 23 se ilustran los resultados para TTOG de los diferentes grupos.

**Tabla 24: TTOG para animales en estudio por grupo de tratamiento**

Tiempo de medición en min	Grupo Control Sano	Grupo Control Positivo	Grupo Tratado	Grupo Control Negativo
	Sin Tratamiento	Metformina	EAC G19-1	Agua MilliQ
	<b>Glicemia promedio <math>\pm</math> SEM (mg/dL)</b>			
0	160,0 $\pm$ 5	193,1 $\pm$ 17	326,0 $\pm$ 43	432,6 $\pm$ 22
15	217,9 $\pm$ 7	301,1 $\pm$ 30	448,3 $\pm$ 47	527,6 $\pm$ 26
30	189,5 $\pm$ 6	279,5 $\pm$ 33	466,6 $\pm$ 48	533,2 $\pm$ 33
60	170,0 $\pm$ 5	215,1 $\pm$ 23	420,7 $\pm$ 43	473,4 $\pm$ 36
90	167,0 $\pm$ 6	170,2 $\pm$ 26	391,5 $\pm$ 42	460,8 $\pm$ 22
120	164,2 $\pm$ 6	170,5 $\pm$ 32	357,5 $\pm$ 40	449,4 $\pm$ 20
150	154,4 $\pm$ 6	179,7 $\pm$ 26	331,0 $\pm$ 44	406,4 $\pm$ 22

SEM: Error estándar de la media



**Figura 23: TTOG para animales en estudio por grupo de tratamiento**

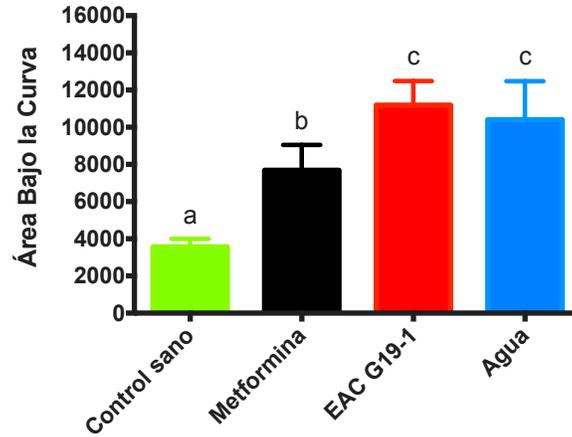
A partir de la Tabla 24 y la Figura 23 se observa que los grupos control sano y control positivo, es decir, que recibieron tratamiento con metformina, retomaron sus niveles normales de glicemia antes de los 60 min de iniciado el ensayo. Por su parte, los grupos control negativo y el grupo tratado con los EACs G19-1 no respondieron bien la carga oral de glucosa y mantuvieron sus niveles de glicemia en concentraciones elevadas hasta casi la finalización del test. Esto evidencia que la secreción de insulina y la síntesis de la misma luego de la carga de glucosa y/o la respuesta a la misma en los tejidos periféricos no fue óptima, por lo que los EACs G19-1 no tuvieron efectos en mejorar la liberación de insulina desde las células beta del páncreas ni en mejorar la sensibilidad a la insulina en los tejidos periféricos.

Lo anterior se corroboró al obtener los valores de área bajo la curva (ABC) para cada grupo, las cuales se graficaron y se ilustran en la Tabla 25 y la Figura 24.

**Tabla 25: Valores de Área Bajo la Curva (ABC) promedio de cada grupo ensayado para TTOG**

<b>Grupo Control Sano</b>	<b>Grupo Control Positivo</b>	<b>Grupo Tratado</b>	<b>Grupo Control Negativo</b>
<b>Sin Tratamiento</b>	<b>Metformina</b>	<b>EAC G19-1</b>	<b>Agua MilliQ</b>
<b>ABC Promedio ± SEM</b>			
3562 ± 430	7687 ± 1359	11186 ± 1295	10407 ± 2067

SEM: Error estándar de la media



\*Letras distintas representan diferencias significativas entre cada grupo a lo largo del estudio.

**Figura 24: Valores de Área Bajo la Curva (ABC) promedio de cada grupo ensayado para TTOG**

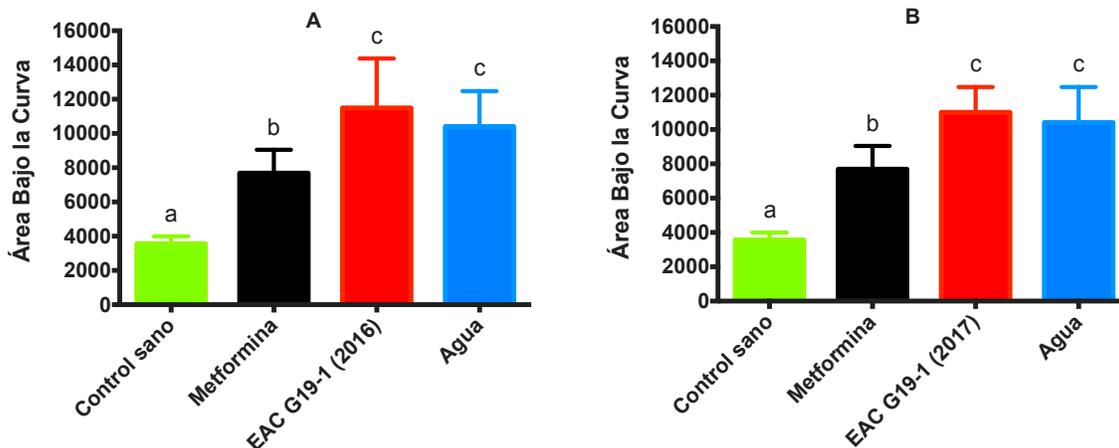
El ABC promedio de cada grupo evidencia que los animales tratados con metformina presentaron una mejor respuesta a la carga de glucosa, a diferencia del grupo tratado con extracto y el grupo control negativo tratado con agua, quienes no presentaron diferencias significativas entre ellos ( $p \leq 0,05$ ).

Si se separa el grupo tratado con extracto en función de los años de cosecha, no se apreciaron diferencias y las ABC de ambas cosechas presentaron valores similares, tal como lo ilustra la Tabla 26 y la Figura 25.

**Tabla 26: Valores de Área Bajo la Curva (ABC) promedio de cada grupo ensayado para TTOG en función del año de cosecha del G19-1**

	Grupo Control Sano	Grupo Control Positivo	Grupo Tratado	Grupo Control Negativo
	Sin Tratamiento	Metformina	EAC G19-1	Agua MilliQ
	<b>ABC Promedio <math>\pm</math> SEM</b>			
<b>Cosecha 2016</b>			11494 $\pm$ 2889	
<b>Cosecha 2017</b>	3562 $\pm$ 430	7687 $\pm$ 1359	11002 $\pm$ 1474	10407 $\pm$ 2067

SEM: Error estándar de la media



\*Letras distintas representan diferencias significativas entre cada grupo a lo largo del estudio.

**Figura 25: Valores de Área Bajo la Curva (ABC) promedio de cada grupo ensayado para TTOG separado por año de cosecha para G19-1**

**A: cosecha 2016; B: cosecha 2017**

### 7.8.5 Análisis de muestras de plasma de los animales sometidos a tratamiento en ensayo *in vivo*

A partir de los animales estudiados en el ensayo *in vivo*, se obtuvieron muestras de plasma para ser analizadas en la pasantía doctoral en el Instituto Pluridisciplinar (IP) de la Universidad Complutense de Madrid (UCM).

En particular se analizaron muestras de 27 animales, 8 para el grupo control sano, 5 para el grupo control negativo, 6 para el grupo control positivo y 8 para el grupo tratado con los EACs G19-1.

### 7.8.5.1 Cuantificación de las concentraciones de adiponectina y de insulina en muestras de plasma

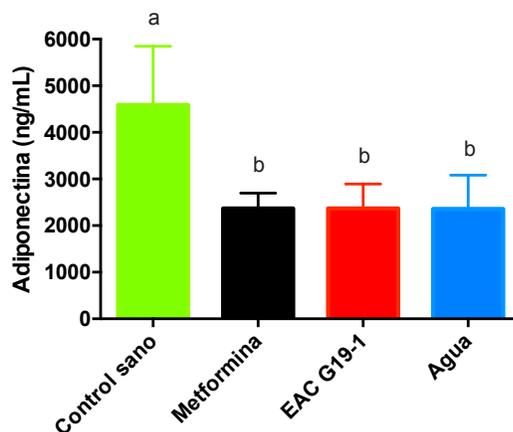
La concentración de insulina y de adiponectina en muestras de plasma de los animales ensayados fueron determinadas a través de kit comerciales ELISA en placas de 96 pocillos. Este ensayo se llevó a cabo para evaluar la respuesta de los animales obesos a los distintos tratamientos en relación a la resistencia a la insulina y a la secreción de adiponectina por parte de los adipocitos. Esta reportado que en animales obesos esta adipocitocina está subexpresada y se presenta en concentraciones plasmáticas menores que en animales de peso normal. En función de lo anterior, un fármaco o extracto que sea capaz de recuperar parcialmente o sea capaz de normalizar la sensibilidad a la insulina en un organismo que presenta resistencia a la acción de esta hormona, debiera también incrementar los valores plasmáticos de adiponectina (Palomer, Pérez, & Blanco-Vaca, 2005).

En la Tabla 27 y Figura 26 se ilustran los valores promedio obtenidos para adiponectina.

**Tabla 27: Concentración de adiponectina en muestras de plasma**

	<b>Grupo Control Sano Sin Tratamiento</b>	<b>Grupo Control Positivo Metformina</b>	<b>Grupo Tratado EAC G19-1</b>	<b>Grupo Control Negativo Agua MilliQ</b>
	<b>Promedio ± SEM (ng/mL)</b>			
<b>Adiponectina</b>	4590 ± 1259	2367 ± 330	2365 ± 528	2358 ± 724

SEM: Error estándar de la media



\*Letras distintas representan diferencias significativas entre cada grupo a lo largo del estudio.

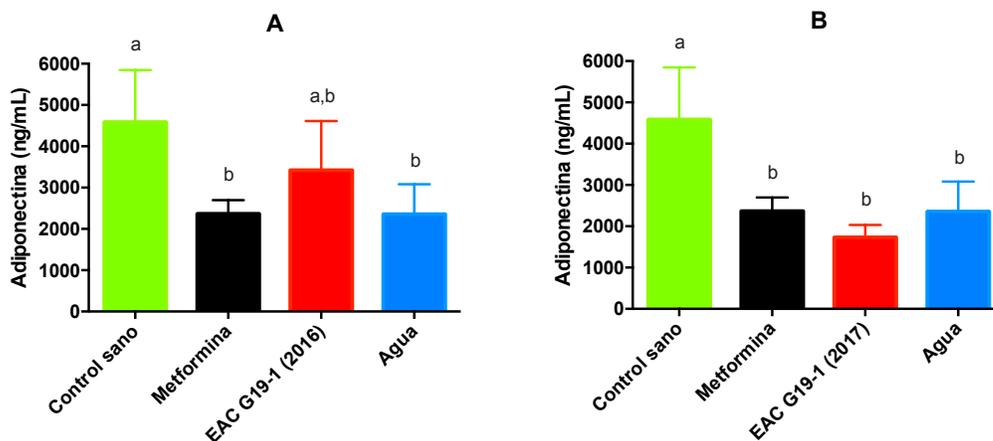
**Figura 26: Concentración de adiponectina en muestras de plasma**

Si se separa el grupo tratado con extracto en función de los años de cosecha, las concentraciones de adiponectina en ratones tratados con ambas cosechas no presentaron diferencias significativas ( $p \leq 0,05$ ), tal como lo ilustra la Tabla 28 y la Figura 27.

**Tabla 28: Concentración de adiponectina en muestras de plasma en función del año de cosecha del G19-1**

	Grupo Control Sano	Grupo Control Positivo	Grupo Tratado	Grupo Control Negativo
	Sin Tratamiento	Metformina	EAC G19-1	Agua MilliQ
	<b>Concentración promedio de adiponectina (ng/mL) <math>\pm</math> SEM</b>			
<b>Cosecha 2016</b>	4590 $\pm$ 1259	2367 $\pm$ 330	3420 $\pm$ 1190	2358 $\pm$ 724
<b>Cosecha 2017</b>			1733 $\pm$ 299	

SEM: Error estándar de la media



\*Letras distintas representan diferencias significativas entre cada grupo a lo largo del estudio.

**Figura 27: Concentración de adiponectina en muestras de plasma**

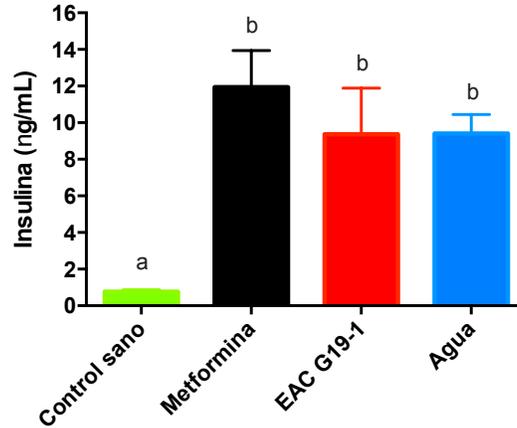
**A: cosecha 2016; B: cosecha 2017**

Por su parte, la Tabla 29 y la Figura 28 se ilustran los valores promedio obtenidos para concentración de insulina plasmática.

**Tabla 29: Concentración de insulina en muestras de plasma**

	Grupo Control Sano	Grupo Control Positivo	Grupo Tratado	Grupo Control Negativo
	Sin Tratamiento	Metformina	EAC G19-1	Agua MilliQ
	Promedio ± SEM (ng/mL)			
Insulina	0,76 ± 0,11	11,94 ± 2,00	9,36 ± 2,52	9,41 ± 1,03

SEM: Error estándar de la media



\*Letras distintas representan diferencias significativas entre cada grupo a lo largo del estudio.

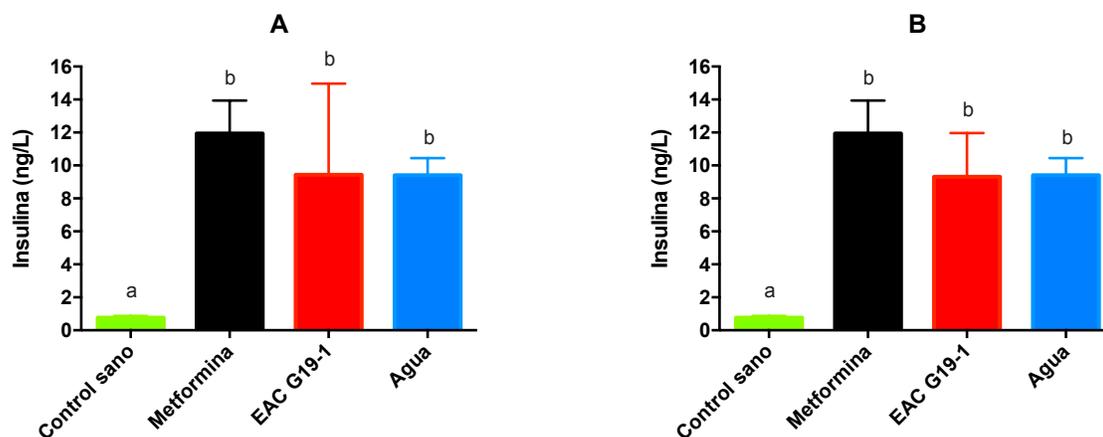
**Figura 28: Concentración de adiponectina e insulina en muestras de plasma**

Si se separa el grupo tratado con extracto en función de los años de cosecha, las concentraciones de insulina en ratones tratados con ambas cosechas no presentaron diferencias significativas ( $p \leq 0,05$ ), tal como lo ilustra la Tabla 30 y la Figura 29.

**Tabla 30: Concentración de insulina en muestras de plasma en función del año de cosecha del G19-1**

	Grupo Control Sano	Grupo Control Positivo	Grupo Tratado	Grupo Control Negativo
	Sin Tratamiento	Metformina	EAC G19-1	Agua MilliQ
	Concentración promedio de insulina (ng/mL) $\pm$ SEM			
<b>Cosecha 2016</b>			9,42 $\pm$ 5,53	
<b>Cosecha 2017</b>	0,76 $\pm$ 0,11	11,94 $\pm$ 2,00	9,31 $\pm$ 2,65	9,41 $\pm$ 1,03

SEM: Error estándar de la media



\*Letras distintas representan diferencias significativas entre cada grupo a lo largo del estudio.

**Figura 29: Concentración de insulina en muestras de plasma**

**A: cosecha 2016; B: cosecha 2017**

Las tablas y figuras anteriores evidencian las diferencias esperadas entre el grupo control sano y los animales obesos de los grupos tratados. En relación a la adiponectina, los grupos de animales obesos presentaron valores de concentración plasmática esperados en comparación a los animales sanos no obesos. Al comparar los distintos tratamientos se evidencia que no hubo diferencias significativas ( $p \leq 0,05$ ) entre los animales tratados con metformina y los tratados con extracto del G19-1, con respecto al grupo control negativo.

En cuanto a la insulina plasmática, se apreció que los animales obesos presentaron valores de insulínemia relacionados con una resistencia a la acción de esta hormona y que dista de los valores plasmáticos de animales sanos no obesos. Al igual que en el caso de adiponectina, no existieron diferencias significativas ( $p \leq 0,05$ ) entre los grupos tratados con respecto al control negativo.

Ambas mediciones permiten confirmar que los tratamientos aplicados no tuvieron efectos positivos en la resistencia a la insulina que presentan los animales del modelo *in vivo* estudiado.

## **7.9 Correlación de las actividades farmacológicas estudiadas con la composición fenólica de los extractos evaluados**

Una vez reunidos todos los resultados de los ensayos *in vitro* e *in vivo*, fue posible analizar el perfil fenólico de los EAC de los diferentes genotipos evaluados y correlacionar las actividades farmacológicas estudiadas.

A pesar de que la composición química entre los EACs de los genotipos evaluados fue similar, si hubo una diferencia significativa en la CFT respecto a los EEAs. Esto sugiere que diferencias específicas en la mezcla de compuestos fenólicos y la cantidad de los mismos determinó que existieran diferencias en la capacidad antioxidante observada en los ensayos DPPH y ORAC. En particular, los EACs de los G19-1 de la cosecha 2016 y G22-1 presentaron las mayores potencias inhibitorias sobre las enzimas que regulan el metabolismo glucídico, así como las mayores capacidades antioxidantes. Ambos genotipos tienen en común el haber presentado, en el análisis semicuantitativo, altas intensidades en peaks identificados tentativamente como derivados de los ácidos gálico y elágico, así como derivados de quercetina, miricetina, luteolina e isoramnetina (Fracassetti, Costa, Moulay, & Tomás-Barberán, 2013; Jakobs, Fridrich, Hofem, Pahlke, & Eisenbrand, 2006; Li, Zhou, Gao, Bian, & Shan, 2009; Ou et al., 2001; Zhao, Zhou, Chen, & Wang, 2009). Interesantemente, en el EAC del G19-1 cosecha 2016 se identificaron tentativamente los ácidos cítrico, quínico y galoilquínico, metoxiquercetina-O-hexósido, canferol-O-cumaroilglucósido, miricetina-O-pentósido y miricetina-O-ranmósido, compuestos que no fueron identificados en los otros genotipos analizados. Esto podría explicar los destacados resultados del G19-1 en los ensayos farmacológicos *in vitro*.

Compuestos aislados como ácidos fenólicos, quercetina, rutina o catequina han demostrado capacidad antioxidante en el ensayo ORAC (Ou et al., 2001). Por lo tanto, las diferencias observadas entre los genotipos de frutos de murtila podrían explicarse por la variación en la

presencia de estos derivados fenólicos específicos, así como por la variación en la CFT de cada extracto.

Por su parte, compuestos fenólicos aislados tales como ácido gálico, miricetina y quercetina han mostrado capacidad de inhibir la actividad de  $\alpha$ -glucosidasa, lo cual podría explicar la interesante capacidad de los extractos de frutos de murtila. En particular, una elevada presencia de estos compuestos en los EAC podría explicar las diferencias en potencia inhibitoria entre ambas series de extractos (Li et al., 2009; Yin, Zhang, Feng, Zhang, & Kang, 2014; Zhao et al., 2009).

En cuanto a GP<sub>a</sub>, quercetina ha demostrado capacidad inhibitoria sobre esta enzima, lo que podría explicar, en parte, que los frutos de murtila tuvieran la capacidad de inhibir la acción de esta fosforilasa (Jakobs et al., 2006).

Si se comparan los EACs de las 2 cosechas del G19-1, el análisis químico permitió evidenciar que el perfil fenólico no fue el mismo, destacando que la cosecha 2016 presentó una amplia variedad de ácidos fenólicos y compuestos del tipo flavonoide, así como algunos compuestos que no fueron identificados en el resto de los genotipos ni en la cosecha 2017. Por su parte, la cosecha 2017 presentó mayoritariamente ácidos fenólicos y derivados de catequina y epicatequina, siendo minoritarios los compuestos del tipo flavonoides. Esto podría explicar las diferencias que se presentaron en los distintos ensayos *in vitro* entre ambas cosechas, en que fue siempre superior el desempeño del EAC de la cosecha 2016.

Los resultados *in vitro* permitieron seleccionar al G19-1 de la cosecha 2016 para que fuera ensayado en el estudio *in vivo*. Sin embargo, luego del inicio del estudio con los animales, se evidenció que el extracto disponible no iba a ser suficiente para alcanzar a tratar a todos los animales del grupo, razón por la que se decidió, durante el estudio, emplear el EAC de la cosecha 2017 del mismo G19-1. El análisis químico y farmacológico *in vitro* de la cosecha

2017 se llevó a cabo en paralelo al ensayo con los animales, razón por la que no se contó con la información reportada en el presente informe.

En los parámetros de control metabólico fue posible diferenciar a los animales que recibieron las distintas cosechas, lo que permitió corroborar que hubo tendencias diferentes, por ejemplo, en la ganancia de peso y en el consumo de alimento en donde los animales que recibieron cosecha 2016 presentaron una tendencia a ganar menos peso y a consumir menos alimento. Esta tendencia también se apreció en el control diario de las glicemias, observando una estabilización de las glicemias en los animales que recibieron cosecha 2016, en contraste a los animales que recibieron cosecha 2017 en que se evidenció que las glicemias promedio continuaron aumentando a medida que se desarrolló el estudio, a la par del grupo control negativo. Sin embargo, estos resultados no presentaron significancia estadística respecto a los grupos control positivo y control negativo, probablemente debido al bajo número de animales que recibió la cosecha 2016, lo que significó una amplia variabilidad en los resultados obtenidos. En función de lo anterior, es que no se puede descartar llevar a cabo un nuevo ensayo *in vivo*, que permita administrar a un mayor número de animales los extractos del mismo G19-1, analizados previamente en cuanto a su perfil fenólico para corroborar la presencia de los compuestos fitoquímicos que serían los responsables de los positivos resultados obtenidos para la cosecha 2016 en los ensayos *in vitro*, sobre todo considerando la potencia inhibitoria sobre la actividad de  $\alpha$ -glucosidasa que presentaron los extractos y la amplia diferencia en potencia por sobre la acarbosa.

En este sentido, diseñar y llevar a cabo un ensayo que evalúe el efecto del extracto sobre las glicemias postprandiales de los animales, comparando grupos que reciban: i) EAC del G19-1, ii) acarbosa y iii) acarbosa + EAC del G19-1, permitiría confirmar que los resultados *in vitro* serían extrapolables a lo que pudiera ocurrir *in vivo*.

## 8. CONCLUSIONES

En el presente trabajo se llevó a cabo un estudio químico y farmacológico comparativo con extractos fenólicos (extractos acetónicos y etanólicos ácidos) obtenidos de los frutos de 8 genotipos de *Ugni molinae* (murtilla) cultivados en las mismas condiciones edafoclimáticas.

Los extractos acetónicos (EACs) presentaron un mayor contenido de fenoles totales que los extractos etanólicos ácidos (EEAs).

Los extractos acetónicos presentaron una mayor potencia antioxidante que los extractos etanólicos ácidos en los ensayos de apagamiento del radical DDPH y de neutralización de los radicales peroxilos y alcoxilos que se generan en los ensayos ORAC-FL y ORAC-PGR.

La potencia inhibitoria sobre la actividad de  $\alpha$ -glucosidasa de ambas series de extractos fue muy superior a la del fármaco de referencia (acarbose). Los extractos acetónicos fueron más activos que los extractos etanólicos.

Ambas series de extractos inhibieron la actividad de la glicógeno fosforilasa A, sin embargo, con una menor potencia en relación a la sustancia de referencia (cafeína). Los extractos acetónicos fueron más activos que los extractos etanólicos ácidos.

Los extractos acetónicos obtenidos desde los frutos del G19-1, variedad Red Pearl registrada por el INIA, y de los frutos del G22-1 presentaron los mejores resultados en los ensayos antioxidantes e inhibidores de la actividad de la  $\alpha$ -glucosidasa y de la glicógeno fosforilasa A. Tales extractos presentan dentro de su composición una mezcla de compuestos químicos con una mayor presencia de flavonoides específicos derivados de quercetina y miricetina, así como derivados de ácidos fenólicos como los ácidos gálicos y elágico.

Se informa por primera vez la presencia de isoramnetina, taxifolina y derivados de epicatequina en frutos de murtilla.

Se seleccionó el EAC del G19-1 y se evaluó en un estudio *in vivo* en animales que representan

un modelo de DMT2. Los resultados obtenidos no evidenciaron un efecto positivo del extracto de frutos de murtila sobre los distintos parámetros de control metabólico evaluados, sin embargo, en función de que se emplearon dos cosechas diferentes de los frutos del G19-1 y éstas presentaron diferentes resultados en los ensayos farmacológicos *in vitro*, lo cual pudo influenciar los resultados obtenidos *in vivo*, no se puede descartar el realizar un nuevo ensayo en animales que permita corroborar los positivos resultados de los estudios farmacológicos *in vitro*.

Considerando los resultados del análisis químico, ensayos *in vitro* e *in vivo*, se pudo responder al objetivo general de este trabajo, correlacionando el perfil fenólico de los extractos con las actividades farmacológicas evaluadas.

Lo anterior, permitió corroborar parcialmente la hipótesis de este trabajo, ya que la composición fenólica cualitativa y cuantitativa de los extractos obtenidos de los 8 genotipos de murtila influenciaron los resultados obtenidos en los ensayos antioxidantes y en los ensayos de inhibición de la actividad enzimática. Sin embargo, no se pudo demostrar que el extracto seleccionado por los mejores resultados en los ensayos *in vitro* presentara efectos positivos en la glicemia y en los distintos parámetros de control metabólico evaluados en los animales de experimentación que representan un modelo de obesidad asociado a DMT2.

Finalmente, de acuerdo a los resultados obtenidos en el presente trabajo, se puede describir a los frutos de murtila como una rica fuente de compuestos fenólicos bioactivos que permiten considerarlo como un alimento funcional o para ser incorporado en fitomedicamentos, los cuales podrían ser de utilidad en el tratamiento de patologías que cursan con estados hiperglicémicos, tales como la Diabetes Mellitus tipo 2 o el síndrome metabólico, así como también estimular y promover el cultivo de murtila no solo por su valor agronómico y comercial, sino también por sus propiedades farmacológicas.

# 9. PRODUCTIVIDAD DERIVADA DEL TRABAJO DE TESIS DOCTORAL

## 9.1 Presentaciones en Congresos

Asistencia en calidad de autor en modalidad poster al XXXIX Congreso de la Sociedad de Farmacología de Chile llevado a cabo en la ciudad de Puerto Varas entre el 22 y 25 de noviembre de 2017, para presentar el trabajo denominado: “Actividad inhibitoria sobre  $\alpha$ -glucosidasa de extractos fenólicos de frutos de 8 genotipos de *Ugni Molinae* Turcz”.



### Inhibitory activity on $\alpha$ -glucosidase of phenolic extracts from fruits of 8 genotypes of *Ugni Molinae* Turcz.

### Actividad inhibitoria sobre $\alpha$ -glucosidasa de extractos fenólicos de frutos de 8 genotipos de *Ugni Molinae* Turcz.

**Ordóñez, J.L.<sup>1</sup>, González, J.<sup>1</sup>, Pérez, R.<sup>1</sup>, Rivas, F.<sup>1</sup>, Seguel, I.<sup>2</sup>, Delporte, C.<sup>1</sup>**

<sup>1</sup>Laboratorio de Productos Naturales, Departamento de Química Farmacológica y Toxicológica, Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas, Universidad de Chile  
<sup>2</sup>Instituto de investigaciones agropecuarias (INIA) Carillanca  
 Email: jrdonez@postafy.uchile.cl

---

#### INTRODUCTION

One strategy to discover natural products with hypoglycemic properties is by searching through folk medicinal plants, like *Ugni molinae* (Myrtaceae). This shrub is commonly known as murtilia.

Previously, the Natural Products Laboratory of Universidad de Chile demonstrated the inhibitory activity on  $\alpha$ -glucosidase of leaves extracts from 8 genotypes of murtilia collected from the germplasm bank of INIA-Carillanca, which were cultivated under the same edaphoclimatic conditions (Veas, 2015).

The aim of this work was to determine the total phenolic content (TPC) and to demonstrate and compare the inhibitory activity of acetone (EAC) and ethanolic acid (EEA) fruits extracts from the same 8 genotypes of murtilia on  $\alpha$ -glucosidase.

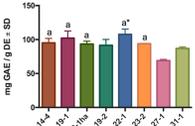
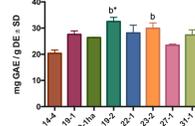
This enzyme is located in the microvilli of the enterocytes, hydrolyzing complex carbohydrates and disaccharides into absorbable monosaccharides, thus causing an increase in postprandial glycemic levels (Alejandro *et al.*, 2013).

Both, the inhibitory activity and the TPC were evaluated spectrophotometrically in 96 well plates. The TPC was expressed as mg of gallic acid equivalents (GAE) per g of dry extract (DE) and the inhibitory activity on  $\alpha$ -glucosidase as IC<sub>50</sub> in  $\mu$ g of DE per mL, using acarbose as a positive control.

#### RESULTS

##### Total phenolic content (TPC) of murtilia fruit's extracts

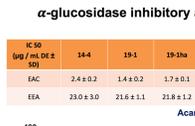
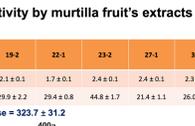
mg GAE / g DE $\pm$ SD	14-4	19-1	19-3ha	19-2	22-1	23-2	27-1	31-1
EAC	95.2 $\pm$ 6.4	102.2 $\pm$ 10.3	93.4 $\pm$ 4.1	91.3 $\pm$ 8.7	107.7 $\pm$ 7.8	93.9 $\pm$ 0.5	69.0 $\pm$ 1.8	86.9 $\pm$ 2.3
EEA	20.9 $\pm$ 1.2	27.5 $\pm$ 1.3	26.3 $\pm$ 0.1	32.5 $\pm$ 1.6	28.1 $\pm$ 2.9	29.9 $\pm$ 2.0	23.4 $\pm$ 0.4	27.4 $\pm$ 1.9

**Graph 1: TPC for EAC      Graph 2: TPC for EEA**

##### $\alpha$ -glucosidase inhibitory activity by murtilia fruit's extracts

IC <sub>50</sub> ( $\mu$ g / mL DE $\pm$ SD)	14-4	19-1	19-3ha	19-2	22-1	23-2	27-1	31-1
EAC	2.4 $\pm$ 0.2	1.4 $\pm$ 0.2	1.7 $\pm$ 0.1	2.1 $\pm$ 0.1	1.7 $\pm$ 0.1	2.4 $\pm$ 0.1	2.4 $\pm$ 0.1	2.3 $\pm$ 0.1
EEA	23.0 $\pm$ 3.0	21.6 $\pm$ 1.1	21.8 $\pm$ 1.2	29.9 $\pm$ 2.2	29.4 $\pm$ 0.8	44.8 $\pm$ 1.7	21.4 $\pm$ 1.1	26.2 $\pm$ 2.0

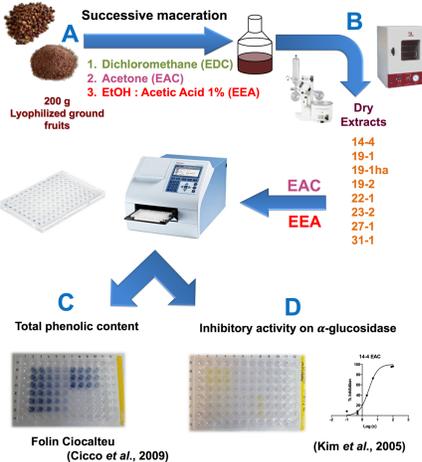



**Graph 3: IC<sub>50</sub> for EAC      Graph 4: IC<sub>50</sub> for EEA**

Acarbose = 323.7  $\pm$  31.2

---

#### METODOLOGY



**Figure 1: Sequential work scheme:**  
 A. Extraction from raw material  
 B. Concentration and drying of extracts  
 C. Quantification of TPC  
 D. Evaluation of inhibitory activity of  $\alpha$ -glucosidase

#### CONCLUSIONS

Our results show that the fruits of murtilia are a rich source of bioactive phenolic compounds with potential as therapeutic agents in the treatment of hyperglycemic states, like diabetes mellitus or the metabolic syndrome. This could be achieved by the development of functional foods or phytotherapeutics based on this berry.

In addition, our results will help INIA-Carillanca to classify the genotypes due to their potential hypoglycemic effects, allowing the promotion of crops of murtilia not only by their agronomic value, but also by their medicinal properties.

---

#### REFERENCES

- Veas, R. (2015). Evaluación de la actividad inhibitoria de  $\alpha$ -glucosidasa de los extractos de hojas de diez genotipos de *Ugni molinae* Turcz. y determinación del tipo de inhibición (Memoria para optar al título de Químico Farmacéutico), Universidad de Chile, Santiago.
- Alejandro-Espinoza, M., Jaramillo-Fierro, J., Ojeda-Riascos, S., Malagon-Aviles, O. y Ramirez-Robles, J. (2013) Actividad antidiabetica y antihiperglicemica de la especie medicinal *Chocalla grandiflora* (Lam.) R. Br. et al. del Ecuador. Boletín Latinoamericano y del Caribe de Plantas Medicinales y Aromáticas 12 (1): 59 - 68.
- Cicco, N., Laneris, M. T., Parragón, M., Viggiani, M. & Latorre, V. (2009). A reproducible, rapid and insensitive Folin-Ciocalteu micro-method in determining phenolics of plant methanol extracts. Microchemical Journal, 91(1), 107-110.
- Kim, Y.M., Jeong, Y.C., Hwang, M.H., Lee, W.Y. & Rhee, H.C. (2002). Inhibitory effect of pine extract on  $\alpha$ -glucosidase activity and postprandial hyperglycemia. Nutrition (Burbank, Los Angeles County, Calif.), 21(8), 756-761.

Acknowledgement: FONDECYT N°1130155, Beca Conicyt N°21150851, Beca Conicyt N°21150769, INIA-Carillanca, SouthAm Freeze Dry

Asistencia en calidad de autor en modalidad poster al II Jornada Phday de la Facultad de Farmacia de la Universidad Complutense llevado a cabo en la ciudad de Madrid el 28 de noviembre de 2018, para presentar el trabajo denominado: "Evaluation *in vitro* and *in vivo* of potential hypoglycemic effect of phenolic fruits extract of *Ugni molinae* Turcz".

## Evaluation *in vitro* and *in vivo* of potential hypoglycemic effect of phenolic fruits extract of *Ugni molinae* Turcz.

**J.L. Ordóñez-Belmar<sup>1</sup>, R. Pérez-Arancibia<sup>1</sup>, I. Seguel-Benitez<sup>2</sup>, J. Ruiz-Muñoz<sup>3</sup>, F. Ezquer-Romero<sup>3</sup>, M. Fernández-Alfonso<sup>4</sup>, C. Delporte-Vergara<sup>1</sup>**

<sup>1</sup>Laboratorio de Productos Naturales, Departamento de Química Farmacológica y Toxicológica, Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas, Universidad de Chile.  
<sup>2</sup>Instituto de investigaciones agropecuarias (INIA) Carillanca, Chile.  
<sup>3</sup>Centro de Medicina Regenerativa, Facultad de Medicina, Clínica Alemana - Universidad del Desarrollo, Santiago, Chile.  
<sup>4</sup>GESCAMET, Instituto Pluridisciplinar, Facultad de Farmacia, Universidad Complutense de Madrid, España.  
 Email: joctord@gmail.com

### INTRODUCTION

One strategy to discover natural products with hypoglycemic properties is by searching through folk medicinal plants, like *Ugni molinae* (Myrtaceae). This shrub is native from Chile and is commonly known as murtilla.

Previously, the Natural Products Laboratory of Universidad de Chile demonstrated the inhibitory activity on  $\alpha$ -glucosidase and glycogen phosphorylase A (Gpa) of leaves extracts from different genotypes of murtilla collected from the germplasm bank of INIA-Carillanca, which were cultivated under the same edaphoclimatic conditions (Bugueño, 2015; Veas, 2015).

The aim of this work was to demonstrate the inhibitory activity on  $\alpha$ -glucosidase and GPa of acetone (EAC) fruits extract from genotype 19-1 of murtilla (EAC G19-1), registered and patented by INIA as Red Pearl-INIA, and to evaluate the potential hypoglycemic effect of EAC G19-1 on *in vivo* model of type 2 diabetes mellitus (T2DM). The inhibitory activity was evaluated spectrophotometrically in 96 well plates and expressed as IC<sub>50</sub> in  $\mu$ g of dry extract (DE) per mL, using acarbose and caffeine as a positive control, respectively.

The *in vivo* experiment was carried out with 3 groups of obese mice and 1 group of lean mice, as a control, of BKS.Cg-m<sup>+/+</sup>Lep<sup>ob/ob</sup> strain. The mice was controlled 3 days before the administration p.o. of EAC G19-1, metformin, as a positive control, or water, as a negative control, for 10 days. Metabolic parameters like glycemic levels, weight gain and food consumption was registered. At the end of the experiment, samples of plasma, heart, liver and adipose tissues was reserved for analysis of biomarkers of T2DM and oxidative stress.

### RESULTS

#### $\alpha$ -glucosidase and GPa inhibitory activity by murtilla fruit's extract

Genotype	19-1	Acarbose	Genotype	19-1	Caffeine
IC <sub>50</sub> ( $\mu$ g / mL DE $\pm$ SEM)	1.4 $\pm$ 0.2	323.7 $\pm$ 31.2	IC <sub>50</sub> ( $\mu$ g / mL DE $\pm$ SEM)	33.4 $\pm$ 5.8	5.3 $\pm$ 0.7

Figure 2: IC<sub>50</sub> for  $\alpha$ -glucosidase and GPa inhibitory activity

#### Evaluation *in vivo* of the potential hypoglycemic effect by murtilla fruit's extract

Figure 3: Metabolic parameters evaluated during the *in vivo* experiment  
 A: Percentage variation of daily glycemia  
 B: Accumulated food consumption; C: Accumulated weight gain

Results are expressed in mean  $\pm$  SEM  
 Statistical analysis (T test, ANOVA and Tukey multiple comparisons test)  
 Different letters on bars represent significant differences (p<0.05)

### METODOLOGY

### CONCLUSIONS

Our *in vitro* results show that the fruits of murtilla are a rich source of bioactive phenolic compounds able to inhibiting the activity of enzymes related to the carbohydrates metabolism and with a potential as therapeutic agents in the treatment of hyperglycemic states.

However, the selected metabolic parameters on *in vivo* experiment show no differences in food consumption or weight gain among obese groups. For the percentage glycemic variation during the experiment, the positive control achieved a normal glycemic level and the group treated with EAC G19-1 showed a lower percentage increment than the negative control.

Analysis of plasma and tissue samples are under development that could show effects not observed in the metabolic control parameters described above.

### REFERENCES

- Veas, R. (2015). Evaluación de la actividad inhibitoria de  $\alpha$ -glucosidasa de los extractos de hojas de diez genotipos de *Ugni molinae* Turcz. y determinación del tipo de inhibición (Memoria para optar al título de Químico Farmacéutico), Universidad de Chile, Santiago.
- Bugueño, I. (2015). Evaluación de las propiedades inhibitorias sobre enzimas que regulan la glicemia de extractos de hojas de diferentes genotipos de *Ugni molinae* (Memoria para optar al título de Químico Farmacéutico), Universidad de Chile, Santiago.
- Cicco, M., Lanore, M. T., Fargnoli, M., Viggiano, M., & Lattanzio, V. (2009). A reproducible, rapid and inexpensive Folin-Ciocalteu micro-method in determining phenolics of plant methanol extracts. *Microchemical Journal*, 91(1), 107-110.
- Kim, Y.-M., Jeong, Y.-K., Wang, M.-H., Lee, W.-Y., & Rhae, H.-I. (2005). Inhibitory effect of pine extract on  $\alpha$ -glucosidase activity and postprandial hyperglycemia. *Nutrition (Burbank, Los Angeles County, Calif.)*, 21(6), 756-761.
- Karis, M. D., Longhini, W. A., Jenkins, I. D., & Healy, P. C. (2009). Glycogen phosphorylase inhibitory effects of 2-oxo-1,2-dihydroxyindol-3-yl amide derivatives. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 17(11), 4724-4732.

Asistencia en calidad de autor en modalidad poster al XLI Congreso de la Sociedad de Farmacología de Chile llevado a cabo en la ciudad de Concepción entre el 04 y 08 de noviembre de 2019, para presentar el trabajo denominado: "Inhibitory activity of glycogen phosphorylase A of phenolic extracts from leaves and fruits of 8 *Ugni molinae* Turcz genotypes"



Facultad de  
Ciencias Químicas  
y Farmacéuticas  
Universidad de Chile



## Inhibitory activity on glycogen phosphorylase A of phenolic extracts from leaves and fruits of 8 *Ugni Molinae* Turcz genotypes

**Ordóñez, J.L.<sup>1</sup>, González, J.<sup>1</sup>, Pérez, R.<sup>1</sup>, Bugueño, I.<sup>1</sup>, Guzmán, P.<sup>1</sup>, Seguel, I.<sup>2</sup>, Delporte, C.<sup>1</sup>**

<sup>1</sup>Laboratorio de Productos Naturales, Departamento de Química Farmacológica y Toxicológica, Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas, Universidad de Chile  
<sup>2</sup>Instituto de investigaciones agropecuarias (INIA) Carillanca  
Email: jordonez@postqf.uchile.cl

---

### INTRODUCTION

One of the strategies used for the discovery of natural products with hypoglycemic activity is the analysis of species used by traditional medicine, such as *Ugni molinae*, Myrtaceae, popularly known as murtilla. In this context, the analysis of the inhibition on the activity of Glycogen phosphorylase A (Gpa), an enzyme expressed in brain, muscle and liver, which has major role on post-prandial hyperglycemic peaks in diabetic patients, could account for potential candidates for the development of new treatments (Baker et al, 2005; Baker et al, 2006).

The aim of this work was to demonstrate and compare the Gpa inhibitory activity of phenolic-rich extracts obtained from leaves and fruits of 8 murtilla genotypes from the INIA-Carillanca germplasm bank, which were cultivated at the same edaphoclimatic conditions.

The inhibitory activity was evaluated spectrophotometrically in 96 well plates and was expressed as IC<sub>50</sub> in µg of dry extract (DE) per mL, using caffeine as a positive control (Karis et al, 2009)

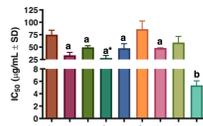
### RESULTS

#### Glycogen phosphorylase A inhibitory activity by murtilla leaves and fruit's extracts

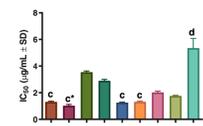
Table 1: IC<sub>50</sub> for fruits EAC and leaves EET

IC <sub>50</sub> (µg/mL DE ± SD)	14-4	19-1	19-1ha	19-2	22-1	23-2	27-1	31-1
Fruits EAC	75.1 ± 8.8	33.4 ± 5.8	49.4 ± 3.3	27.9 ± 5.1	47.6 ± 9.1	66.1 ± 16.4	48.1 ± 0.2	59.2 ± 12.3
Leaves EET	1.31 ± 0.06	1.03 ± 0.09	3.54 ± 0.09	2.89 ± 0.10	1.28 ± 0.04	1.32 ± 0.05	2.02 ± 0.09	1.75 ± 0.05

Caffeine = 5.3 ± 0.7

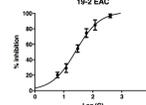


Graph 1: IC<sub>50</sub> for fruits EAC

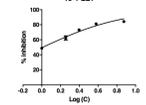


Graph 2: IC<sub>50</sub> for leaves EET

Statistical analysis (ANOVA and Tukey multiple comparisons test): Same letters on bars represent no significant differences (p>0.05) in relation with the more active extract marked with \* in each graph.



Graph 3: Inhibition curve for 19-2 fruits EAC



Graph 4: Inhibition curve for 19-1 leaves EET

Inhibition curves for more potent genotypes extracts for fruits (19-2) and leaves (19-1).

### METODOLOGY



200 g  
Lyophilized ground  
fruits



2,0 Kg  
dry ground leaves

Successive maceration

1. Dichloromethane (EDCM)
2. Acetone (EAC)
3. EtOH : Acetic Acid 1% (EEA)

1. Hexane (EHE)
2. Dichloromethane (EDCM)
3. Ethyl Acetate (EAE)
4. Ethanol (EET)



Dry  
Extracts



EAC



EET

14-4 19-1 19-1ha 19-2 22-1 23-2 27-1 31-1



Inhibitory activity on glycogen phosphorylase A



(Karis et al., 2009)

### CONCLUSIONS

Leaves extracts were 2 to 5 fold more potent than caffeine, while fruit extracts were 5 to 16 fold less potent than the positive control. Comparing each genotype, leaves extracts were 10 to 65 fold more potent than fruits extracts.

In addition to the phenolic content, leaves extracts include in their composition some triterpenes with inhibitory activity on glycogen phosphorylase A, which could explain the differences in potency with fruits extracts.

Based on our results, the leaves and fruits of *U. molinae* could be a potential source of bioactive phenolic compounds for the treatment of hyperglycemia, through the development of functional foods or phytopharmaceuticals.

On the other hand, based on the results from this work, INIA-Carillanca will be able to classify the genotypes for their potential hypoglycemic effects, which will allow them in the future to promote the cultivation of murtilla for its agronomic and commercial value, as well as for its medicinal properties.

### REFERENCES

Baker, D. J., Greenhaff, P. L., & Timmons, J. A. (2006). Glycogen phosphorylase inhibition as a therapeutic target: a review of the recent patent literature. *Expert Opinion on Therapeutic Patents*, 16(4), 459-466. doi: 10.1517/13543776.16.4.459.

Baker, D. J., Timmons, J. A., & Greenhaff, P. L. (2005). Glycogen Phosphorylase Inhibition in Type 2 Diabetes Therapy. *A Systematic Evaluation of Metabolic and Functional Effects in Rat Skeletal Muscle*, 5(48), 2453-2459. doi: 10.2337/diabetes.54.8.2453.

Karis, N. D., Loughlin, W. A., Jenkins, I. D., & Healy, P. C. (2009). Glycogen phosphorylase inhibitory effects of 2-oxo-1,2-dihydropyridin-3-yl amide derivatives. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 17(13), 4724-4733.

### ACKNOWLEDGEMENT

FONDECYT N°1130155, Beca Conicyt N°21150851, Beca Conicyt N°21150769, INIA-Carillanca, SouthAm Freeze Dry

Figure 1: Sequential work scheme:  
A. Extraction from raw material  
B. Concentration and drying of extracts  
C. Evaluation of inhibitory activity on glycogen phosphorylase A

## 9.2 Publicación

Ordoñez J, Pérez Arancibia R, Barriga A, Seguel I, Guzman P, Zúñiga M, Delporte C. “Comparative study of antioxidant and inhibitory activity on  $\alpha$ -glucosidase and glycogen phosphorylase A of berry extracts from *Ugni molinae* genotypes”. Journal of Berry Research. 2022:1-18.

Journal of Berry Research xx (2022) x–xx  
DOI:10.3233/JBR-211552  
IOS Press

1

# Comparative study of antioxidant and inhibitory activity on $\alpha$ -glucosidase and glycogen phosphorylase A of berry extracts from *Ugni molinae* genotypes

José L. Ordóñez<sup>a,b</sup>, Rodrigo Pérez<sup>a</sup>, Andrés Barriga<sup>c</sup>, Ivette Seguel<sup>a</sup>, Paola Guzman<sup>a</sup>, María C. Zúñiga<sup>b</sup> and Carla Delporte<sup>a,\*</sup>

<sup>a</sup>Laboratorio de Productos Naturales, Departamento de Química Farmacológica y Toxicológica, Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas, Universidad de Chile, Dr. Carlos Lorca Tobar 964, Santiago, Chile  
<sup>b</sup>Laboratorio de Química Inorgánica y Analítica, Departamento de Química inorgánica y Analítica, Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas, Universidad de Chile, Dr. Carlos Lorca Tobar 964, Santiago, Chile  
<sup>c</sup>Unidad de Espectrometría de masas, Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas, Universidad de Chile, Dr. Carlos Lorca Tobar 964, Santiago, Chile

Received 15 November 2021  
Accepted 16 March 2022  
Pre-press 2 April 2022

**Abstract.**  
**BACKGROUND:** Sustained hyperglycemia leads to multiple health complications associated with oxidative balance and metabolic pathways alterations. Current treatments for hyperglycemia are not entirely effective thus, the identification of natural products from food sources, such as *Ugni molinae* berries, to reduce hyperglycemia and prevent the deleterious effect of oxidative stress is attractive to develop new therapeutics.  
**OBJECTIVE:** Our aim was to evaluate the antioxidant capacity and the inhibitory activity on  $\alpha$ -glucosidase and glycogen phosphorylase A of polyphenolic extracts from different genotypes of *U. molinae* berries and to comparatively analyze their polyphenolic profile.  
**METHODS:** Berry extraction was performed by exhaustive maceration with increasing-polarity solvents. The antioxidant capacity, and inhibitory activity on enzymes were analyzed by different spectrophotometric methods. Moreover, the chemical profile of bioactive extracts was comparatively evaluated through LC-MS.  
**RESULTS:** 16 semi-purified extracts were obtained and showed antioxidant capacity and inhibitory activity on the evaluated enzymes. Moreover, the chemical analysis showed differences in phenolic profile among the extracts and, particularly, the acetonic extracts were more concentrated in phenolic compounds, which is associated with the more potent activities.  
**CONCLUSIONS:** Our results indicate that murtilla berries' acetonic extracts include a mixture of phenolic compounds that inhibit the activity of two enzymes related to carbohydrate metabolism and have a promising antioxidant capacity.

Keywords: *Ugni molinae*, berries, antioxidant,  $\alpha$ -glucosidase, glycogen phosphorylase A

\*Corresponding author: Carla Delporte, Laboratorio de Productos Naturales, Departamento de Química Farmacológica y Toxicológica, Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas, Universidad de Chile, PO Box 8380492, Dr. Carlos Lorca Tobar 964, Santiago, Chile. E-mail: cdelpor@uchile.cl.

ISSN 1878-5093/\$35.00 © 2022 – IOS Press. All rights reserved.

## 10. BIBLIOGRAFÍA

- ADA. (2021). Standards Of Medical Care In Diabetes - 2021. *The Journal Of Clinical And Applied Research And Education*, 44(1).
- Aguirre, M. C., Delporte, C., Backhouse, N., Erazo, S., Letelier, M. E., Cassels, B. K., . . . Negrete, R. (2006). Topical anti-inflammatory activity of 2 $\alpha$ -hydroxy pentacyclic triterpene acids from the leaves of *Ugni molinae*. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 14(16), 5673-5677. doi:<http://dx.doi.org/10.1016/j.bmc.2006.04.021>
- Ah-Hen, K., Zambra, C. E., Aguero, J. E., Vega-Gálvez, A., & Lemus-Mondaca, R. (2013). Moisture Diffusivity Coefficient and Convective Drying Modelling of Murta (*Ugni molinae* Turcz): Influence of Temperature and Vacuum on Drying Kinetics. *Food and Bioprocess Technology*, 6(4), 919-930. doi:10.1007/s11947-011-0758-5
- Al-Dalen, S., Chavez, T., Martinez, G., Ferreira, E., & Leon, O. (2004). El Equilibrio Redox en la Diabetes y sus Complicaciones. *Acta Farm. Bonaerense*, 23(2), 231-242.
- Alfaro, S., Mutis, A., Palma, R., Quiroz, A., Seguel, I., & Scheuermann, E. (2013). Influence of genotype and harvest year on polyphenol content and antioxidant activity in murtilla (*Ugni molinae* Turcz) fruit. *Journal of soil science and plant nutrition*, 13, 67-78.
- Alfaro, S., Mutis, A., Quiroz, A., Seguel, I., & Scheuermann, E. (2014). Effects of Drying Techniques on Murtilla Fruit Polyphenols and Antioxidant Activity. 2014, 3(5). doi:10.5539/jfr.v3n5p73
- Anhê, F. F., Desjardins, Y., Pilon, G., Dudonné, S., Genovese, M. I., Lajolo, F. M., & Marette, A. (2013). Polyphenols and type 2 diabetes: A prospective review. *PharmaNutrition*, 1(4), 105-114. doi:<http://dx.doi.org/10.1016/j.phanu.2013.07.004>
- Arancibia-Radich, J., Peña-Cerda, M., Valenzuela-Bustamante, P., Goity, L., Valenzuela-Barra, G., Silva, X., . . . Seguel, I. (2016). Comparative study of anti-inflammatory activity and qualitative-quantitative composition of triterpenoids from ten genotypes of *Ugni molinae*. *BLACPMA*, 15(5), 274-287.
- Arumugam, G., Manjula, P., & Paari, N. (2013). A review: Anti diabetic medicinal plants used for diabetes mellitus. *Journal of Acute Disease*, 2(3), 196-200. doi:[http://dx.doi.org/10.1016/S2221-6189\(13\)60126-2](http://dx.doi.org/10.1016/S2221-6189(13)60126-2)
- Atala, E., Vásquez, L., Speisky, H., Lissi, E., & López-Alarcón, C. (2009). Ascorbic acid contribution to ORAC values in berry extracts: An evaluation by the ORAC-pyrogallol red methodology. *Food Chemistry*, 113(1), 331-335. doi:<https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2008.07.063>
- Attele, A. S., Zhou Yp Fau - Xie, J.-T., Xie Jt Fau - Wu, J. A., Wu Ja Fau - Zhang, L., Zhang L Fau - Dey, L., Dey L Fau - Pugh, W., . . . Yuan, C. S. (2002). Antidiabetic effects of *Panax ginseng* berry extract and the identification of an effective component. *Diabetes*, 51(6), 1851-1858.
- Augusto, T. R., Salinas, E. S. S., Alencar, S. M., D'Arce, M. A. B. R., Camargo, A. C. d., & Vieira, T. M. F. d. S. (2014). Phenolic compounds and antioxidant activity of hydroalcoholic extracts of wild and cultivated murtilla (*Ugni molinae* Turcz.). *Food Science and Technology (Campinas)*, 34, 667-679.
- Avello, M., Bittner, M., & Becerra, J. (2013). Antibacterial effects of extracts of species of the genus *Ugni* that grow in Chile. *Revista Cubana de Plantas Medicinales*, 18(2), 247-257.
- Avello, M., & Pastene, E. (2005). Actividad antioxidante de infusos de UGNI MOLINAE TURCZ ("MURTILLA") *Boletín Latinoamericano y del Caribe de Plantas Medicinales y Aromáticas*, 4(2), 33-39.
- Avello, M., Pastene, E., Barriga, A., Bittner, M., Ruiz, E., & Becerra, J. (2014). 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. *International Journal of Pharmacognosy and Phytochemical Research*, 6(4), 746-752.
- Avello, M., Valdivia, R., Mondaca, M. a. A., Ordoñez, J. L., Bittner, M., & Becerra, J. (2009). Actividad de *Ugni molinae* Turcz. frente a microorganismos de importancia clínica. *Boletín*

- Latinoamericano y del Caribe de Plantas Medicinales y Aromáticas*, 8(2), 141-144.
- Avello, M. A., Pastene, E. R., Bustos, E. D., Bittner, M. L., & Becerra, J. A. (2013). Variation in phenolic compounds of *Ugni molinae* populations and their potential use as antioxidant supplement. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, 23, 44-50.
- Bahmani, M., Golshahi, H., Saki, K., Rafieian-Kopaei, M., Delfan, B., & Mohammadi, T. (2014). Medicinal plants and secondary metabolites for diabetes mellitus control. *Asian Pacific Journal of Tropical Disease*, 4, S687-S692. doi:[http://dx.doi.org/10.1016/S2222-1808\(14\)60708-8](http://dx.doi.org/10.1016/S2222-1808(14)60708-8)
- Baker, D. J., Greenhaff, P. L., & Timmons, J. A. (2006). Glycogen phosphorylase inhibition as a therapeutic target: a review of the recent patent literature. *Expert Opinion on Therapeutic Patents*, 16(4), 459-466. doi:10.1517/13543776.16.4.459
- Baker, D. J., Timmons, J. A., & Greenhaff, P. L. (2005). Glycogen Phosphorylase Inhibition in Type 2 Diabetes Therapy. *A Systematic Evaluation of Metabolic and Functional Effects in Rat Skeletal Muscle*, 54(8), 2453-2459. doi:10.2337/diabetes.54.8.2453
- Bodeker, G., & Kronenberg, F. (2002). A Public Health Agenda for Traditional, Complementary, and Alternative Medicine. *Am J Public Health*, 92(10), 1582-1591. doi:10.2105/ajph.92.10.1582
- Brito, A., Areche, C., Sepúlveda, B., Kennelly, E., & Simirgiotis, M. (2014). Anthocyanin Characterization, Total Phenolic Quantification and Antioxidant Features of Some Chilean Edible Berry Extracts. *Molecules*, 19(8), 10936. Retrieved from <http://www.mdpi.com/1420-3049/19/8/10936>
- Campero, M., Ezquer, M., & Ezquer, F. (2015). Nerve excitability and structural changes in myelinated axons from diabetic mice. *Exp Clin Endocrinol Diabetes*, 123(8), 485-491.
- Castro, C., Mura, F., Valenzuela, G., Figueroa, C., Salinas, R., Zuñiga, M. C., . . . Delporte, C. (2014). Identification of phenolic compounds by HPLC-ESI-MS/MS and antioxidant activity from Chilean propolis. *Food Research International*, 64, 873-879. doi:<http://dx.doi.org/10.1016/j.foodres.2014.08.050>
- Cicco, N., Lanorte, M. T., Paraggio, M., Viggiano, M., & Lattanzio, V. (2009). A reproducible, rapid and inexpensive Folin–Ciocalteu micro-method in determining phenolics of plant methanol extracts. *Microchemical Journal*, 91(1), 107-110. doi:<http://dx.doi.org/10.1016/j.microc.2008.08.011>
- Delporte, C., Backhouse, N., Inostroza, V., Aguirre, M. C., Peredo, N., Silva, X., . . . Miranda, H. F. (2007). Analgesic activity of *Ugni molinae* (murtilla) in mice models of acute pain. *Journal of Ethnopharmacology*, 112(1), 162-165. doi:<http://dx.doi.org/10.1016/j.jep.2007.02.018>
- Familia, M. d. D. S. y. (2017). *Encuesta de caracterización socioeconómica nacional (CASEN)*. Retrieved from [http://observatorio.ministeriodesarrollosocial.gob.cl/storage/docs/casen/2017/Resultados\\_Adulto\\_Mayores\\_casen\\_2017.pdf](http://observatorio.ministeriodesarrollosocial.gob.cl/storage/docs/casen/2017/Resultados_Adulto_Mayores_casen_2017.pdf)
- Flieger, J., Flieger, W., Baj, J., & Maciejewski, R. (2021). Antioxidants: Classification, Natural Sources, Activity/Capacity Measurements, and Usefulness for the Synthesis of Nanoparticles. *Materials*, 14(15), 4135. Retrieved from <https://www.mdpi.com/1996-1944/14/15/4135>
- Fracassetti, D., Costa, C., Moulay, L., & Tomás-Barberán, F. A. (2013). Ellagic acid derivatives, ellagitannins, proanthocyanidins and other phenolics, vitamin C and antioxidant capacity of two powder products from camu-camu fruit (*Myrciaria dubia*). *Food Chemistry*, 139(1–4), 578-588. doi:<http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2013.01.121>
- Giacco, F., & Brownlee, M. (2010). Oxidative Stress and Diabetic Complications. *Circulation Research*, 107(9), 1058. Retrieved from <http://circres.ahajournals.org/content/107/9/1058.abstract>
- Giner, E., & Castillo, E. (2003). Fitoterapia y Diabetes. *Revista de Fitoterapia*, 3(2), 113-122.
- Goity, L., Quepil, M. a.-J., Jara, D., Alegria, S., Peña, M., Barriga, A. s., . . . Delporte, C. (2013). An HPLC-UV and HPLC-ESI-MS based method for identification of anti-inflammatory triterpenoids from the extracts of *Ugni molinae*. *Boletín Latinoamericano y del Caribe de Plantas Medicinales y Aromáticas*, 12(1), 108 - 116.
- Grace, M. H., Ribnicky, D. M., Kuhn, P., Poulev, A., Logendra, S., Yousef, G. G., . . . Lila, M. A. (2009). Hypoglycemic activity of a novel anthocyanin-rich formulation from lowbush blueberry,

- Vaccinium angustifolium Aiton. *Phytomedicine*, 16(5), 406-415. doi:<http://dx.doi.org/10.1016/j.phymed.2009.02.018>
- Hoffman, A. (1991). *Flora Silvestre de Chile, Zona Araucana*. Santiago: Fundación Editorial Claudi Gay.
- IDF. (2019). *Atlas de la diabetes de la FID*. Retrieved from
- INE. (2022). Esperanza de vida. Retrieved from <https://www.ine.cl/ine-ciudadano/definiciones-estadisticas/poblacion/esperanza-de-vida>
- Jakobs, S., Fridrich, D., Hofem, S., Pahlke, G., & Eisenbrand, G. (2006). Natural flavonoids are potent inhibitors of glycogen phosphorylase. *Mol Nutr Food Res*, 50(1), 52-57. doi:10.1002/mnfr.200500163
- Jamkhande, P. G., Pathan, S. K., & Wadher, S. J. (2016). In silico PASS analysis and determination of antimycobacterial, antifungal, and antioxidant efficacies of maslinic acid in an extract rich in pentacyclic triterpenoids. *International Journal of Mycobacteriology*, 5(4), 417-425. doi:<https://doi.org/10.1016/j.ijmyco.2016.06.020>
- Jorquera, C., & Cancino, J. (2012). Ejercicio, Obesidad y Síndrome Metabólico. *Revista Médica Clínica Las Condes*, 23(3), 227-235. doi:[http://dx.doi.org/10.1016/S0716-8640\(12\)70305-X](http://dx.doi.org/10.1016/S0716-8640(12)70305-X)
- Ju, J. B., Kim, J. S., Choi, C. W., Lee, H. K., Oh, T.-K., & Kim, S. C. (2008). Comparison between ethanolic and aqueous extracts from Chinese juniper berries for hypoglycaemic and hypolipidemic effects in alloxan-induced diabetic rats. *Journal of Ethnopharmacology*, 115(1), 110-115. doi:<http://dx.doi.org/10.1016/j.jep.2007.09.012>
- Junqueira-Gonçalves, P. M., Yáñez, L., Morales, C., Navarro, M., A. Contreras, R., & Zúñiga, E. G. (2015). Isolation and Characterization of Phenolic Compounds and Anthocyanins from Murta (*Ugni molinae* Turcz.) Fruits. Assessment of Antioxidant and Antibacterial Activity. *Molecules*, 20(4). doi:10.3390/molecules20045698
- Karis, N. D., Loughlin, W. A., Jenkins, I. D., & Healy, P. C. (2009). Glycogen phosphorylase inhibitory effects of 2-oxo-1,2-dihydropyridin-3-yl amide derivatives. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 17(13), 4724-4733. doi:<http://dx.doi.org/10.1016/j.bmc.2009.04.049>
- Kawahito, S., Kitahata, H., & Oshita, S. (2009). Problems associated with glucose toxicity: Role of hyperglycemia-induced oxidative stress. *World Journal of Gastroenterology : WJG*, 15(33), 4137-4142. doi:10.3748/wjg.15.4137
- Kim, Y.-M., Jeong, Y.-K., Wang, M.-H., Lee, W.-Y., & Rhee, H.-I. (2005). Inhibitory effect of pine extract on alpha-glucosidase activity and postprandial hyperglycemia. *Nutrition (Burbank, Los Angeles County, Calif.)*, 21(6), 756-761. doi:10.1016/j.nut.2004.10.014
- Król, A., Amarowicz, R., & Weidner, S. (2015). The effects of cold stress on the phenolic compounds and antioxidant capacity of grapevine (*Vitis vinifera* L.) leaves. *J Plant Physiol*, 189, 97-104. doi:10.1016/j.jplph.2015.10.002
- Li, Y. Q., Zhou, F. C., Gao, F., Bian, J. S., & Shan, F. (2009). Comparative Evaluation of Quercetin, Isoquercetin and Rutin as Inhibitors of  $\alpha$ -Glucosidase. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 57(24), 11463-11468. doi:10.1021/jf903083h
- Liu, J., Rajendram, R., & Zhang, L. (2010). Chapter 158 - Effects of Oleanolic Acid and Maslinic Acid on Glucose and Lipid Metabolism: Implications for the Beneficial Effects of Olive Oil on Health. In V. R. Preedy & R. R. Watson (Eds.), *Olives and Olive Oil in Health and Disease Prevention* (pp. 1423-1429). San Diego: Academic Press.
- López, J., Vega-Gálvez, A., Rodríguez, A., Uribe, E., & Bilbao-Sainz, C. (2018). MURTA (*Ugni molinae* Turcz.): A REVIEW ON CHEMICAL COMPOSITION, FUNCTIONAL COMPONENTS AND BIOLOGICAL ACTIVITIES OF LEAVES AND FRUITS. *Chilean journal of agricultural & animal sciences*, 34, 43-56. Retrieved from [https://scielo.conicyt.cl/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0719-38902018000100043&nrm=iso](https://scielo.conicyt.cl/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0719-38902018000100043&nrm=iso)
- López-Alarcón, C., & Denicola, A. (2013). Evaluating the antioxidant capacity of natural products: A review on chemical and cellular-based assays. *Analytica Chimica Acta*, 763, 1-10. doi:<http://dx.doi.org/10.1016/j.aca.2012.11.051>

- Lopez-Alarcon, C., & Lissi, E. (2006). A novel and simple ORAC methodology based on the interaction of Pyrogallol Red with peroxy radicals. *Free Radic Res*, 40(9), 979-985. doi:10.1080/10715760500481233
- MINSAL. (2010). *Guía Clínica Diabetes Mellitus Tipo 2*.
- MINSAL. (2013). *Guía Clínica AUGÉ, Diabetes Mellitus Tipo 1*.
- MINSAL. (2018). *2016-2017. Informe Encuesta Nacional d Salud 2016-2017: Diabetes Mellitus*. Santiago de Chile
- Mohamed, S. (2013). Functional foods against metabolic syndrome (obesity, diabetes, hypertension and dyslipidemia) and cardiovascular disease. *Trends in Food Science & Technology* 35(2), 1-15.
- Montenegro, G. (2000). *Chile nuestra flora útil. Guía de plantas de uso apícola, en medicina folklórica, artesanal y ornamental*. Santiago: Ediciones Universidad Católica de Chile.
- Montenegro, G. (2002). *Chile nuestra flora útil: Guía de plantas de uso apícola, en medicina folclórica, artesanal y Ornamental* (E. U. C. d. Chile Ed.). Santiago, Chile.
- Montes, M., & Wilkomirsky, T. (1996). *Compendio de Fitoterapia*: Facultad de Farmacia, Universidad de Concepción: 4-9.
- Montilla, M. P., Agil, A., Navarro, M. C., Jiménez, M. I., García-Granados, A., Parra, A., & Cabo, M. M. (2003). Antioxidant activity of maslinic acid, a triterpene derivative obtained from *Olea europaea*. *Planta Med*, 69(5), 472-474. doi:10.1055/s-2003-39698
- Muñoz, M., Barrera, E., & Meza, I. (1981). *El uso medicinal y alimenticio de plantas nativas y naturalizadas en Chile*. Santiago: Museo de Historia Natural. Santiago de Chile.
- Muoio, D. M., & Newgard, C. B. (2008). Molecular and metabolic mechanisms of insulin resistance and [beta]-cell failure in type 2 diabetes. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 9(3), 193-205. Retrieved from <http://dx.doi.org/10.1038/nrm2327>
- Myjavcová, R., Marhol, P., Křen, V., Šimánek, V., Ulrichová, J., Palíková, I., . . . Bednář, P. (2010). Analysis of anthocyanin pigments in *Lonicera* (*Caerulea*) extracts using chromatographic fractionation followed by microcolumn liquid chromatography-mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, 1217(51), 7932-7941. doi:<http://dx.doi.org/10.1016/j.chroma.2010.05.058>
- Newgard, C. B., Hwang, P. K., & Fletterick, R. J. (1989). The Family of Glycogen Phosphorylases: Structure and Functio. *Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology*, 24(1), 69-99. doi:10.3109/10409238909082552
- OMS. (2015). Nota Descriptiva N°312, Diabetes. Retrieved from <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs312/es/>
- OMS. (2016). *Informe Mundial Sobre la Diabetes*. Retrieved from
- Ou, B., Hampsch-Woodill, M., & Prior, R. L. (2001). Development and Validation of an Improved Oxygen Radical Absorbance Capacity Assay Using Fluorescein as the Fluorescent Probe. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 49(10), 4619-4626. doi:10.1021/jf010586o
- Palomer, X., Pérez, A., & Blanco-Vaca, F. (2005). Adiponectina: un nuevo nexo entre obesidad, resistencia a la insulina y enfermedad cardiovascular. *Medicina Clínica*, 124(10), 388-395. doi:10.1157/13072576
- Pandey, K. B., & Rizvi, S. I. (2009). Plant polyphenols as dietary antioxidants in human health and disease. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2(5), 270-278. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2835915/>
- Pedro, A. C., Granato, D., & Rosso, N. D. (2016). Extraction of anthocyanins and polyphenols from black rice (*Oryza sativa* L.) by modeling and assessing their reversibility and stability. *Food Chemistry*, 191, 12-20. doi:<http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2015.02.045>
- Peña-Cerda, M., Arancibia-Radich, J., Valenzuela-Bustamante, P., Pérez-Arancibia, R., Barriga, A., Seguel, I., . . . Delporte, C. (2017). Phenolic composition and antioxidant capacity of *Ugni molinae* Turcz. leaves of different genotypes. *Food Chemistry*, 215, 219-227. doi:<http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2016.07.159>
- Pérez-Arancibia, R., Ordoñez, J. L., Rivas, A., Pihán, P., Sagredo, A., Ahumada, U., . . . Delporte, C.

- (2021). A phenolic-rich extract from Ugni molinae berries reduces abnormal protein aggregation in a cellular model of Huntington's disease. *PLoS One*, 16(7), e0254834. doi:10.1371/journal.pone.0254834
- Rodríguez, K., Ah-Hen, K., Vega-Gálvez, A., López, J., Quispe-Fuentes, I., Lemus-Mondaca, R., & Gálvez-Ranilla, L. (2014). Changes in bioactive compounds and antioxidant activity during convective drying of murta (Ugni molinae T.) berries. *International Journal of Food Science & Technology*, 49(4), 990-1000. doi:10.1111/ijfs.12392
- Rubilar, M., Jara, C., Poo, Y., Acevedo, F., Gutierrez, C., Sineiro, J., & Shene, C. (2011). Extracts of Maqui (*Aristotelia chilensis*) and Murta (*Ugni molinae* Turcz.): Sources of Antioxidant Compounds and  $\alpha$ -Glucosidase/ $\alpha$ -Amylase Inhibitors. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 59(5), 1630-1637. doi:10.1021/jf103461k
- Rubilar, M., Pinelo, M., Ihl, M., Scheuermann, E., Sineiro, J., & Nuñez, M. J. (2006). Murta Leaves (*Ugni molinae* Turcz.) as a Source of Antioxidant Polyphenols. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54(1), 59-64. doi:10.1021/jf051571j
- Ruiz, A., Hermosín-Gutiérrez, I., Mardones, C., Vergara, C., Herlitz, E., Vega, M., . . . von Baer, D. (2010). Polyphenols and Antioxidant Activity of Calafate (*Berberis microphylla*) Fruits and Other Native Berries from Southern Chile. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 58(10), 6081-6089. doi:10.1021/jf100173x
- Sakthi, S., Vadivu, R., & Jayshree, N. (2010). In vitro and In vivo antidiabetic activity of the leaves of *Ravenala madagascariensis* Sonn., on alloxan induced diabetic rats *Journal of Pharmaceutical Science and Technology*, 2(9), 312-317.
- Sapunar, J. (2016). Epidemiología de la Diabetes Mellitus en Chile. *Revista Medica de Clinica Las Condes*, 27(2), 146-151.
- Sarkar, D., & Shetty, K. (2014). Chapter 6 - Diabetes as a Disease of Aging, and the Role of Oxidative Stress A2 - Preedy, Victor R. In *Aging* (pp. 61-69). San Diego: Academic Press.
- Seguel, I., Peñaloza, E., Gaete, N., Montenegro, A., & Torres, A. (2000). Colecta y Caracterización Molecular de Germoplasmade Murta (*Ugni molinae* Turcz.) en Chile. *Agro sur*, 28(2), 32-41.
- Seguel, I., & Torralbo, L. (2004). Murtilla: El berrie nativo del sur de Chile. *Revista Tierra Adentro*, 57, 20-25.
- Shene, C., Reyes, A. K., Villarroel, M., Sineiro, J., Pinelo, M., & Rubilar, M. (2009). Plant location and extraction procedure strongly alter the antimicrobial activity of murta extracts. *European Food Research and Technology*, 228(3), 467-475. doi:10.1007/s00217-008-0954-3
- Surya, S., Salam, A. D., Tomy, D. V., Carla, B., Kumar, R. A., & Sunil, C. (2014). Diabetes mellitus and medicinal plants-a review. *Asian Pacific Journal of Tropical Disease*, 4(5), 337-347. doi:[http://dx.doi.org/10.1016/S2222-1808\(14\)60585-5](http://dx.doi.org/10.1016/S2222-1808(14)60585-5)
- Suwalsky, M., Orellana, P., Avello, M., & Villena, F. (2007). Protective effect of Ugni molinae Turcz against oxidative damage of human erythrocytes. *Food and Chemical Toxicology*, 45(1), 130-135. doi:<http://dx.doi.org/10.1016/j.fct.2006.08.010>
- Suwalsky, M., Orellana, P., Avello, M., Villena, F., & Sotomayor, C. P. (2006). Human erythrocytes are affected in vitro by extracts of Ugni molinae leaves. *Food and Chemical Toxicology*, 44(8), 1393-1398. doi:<http://dx.doi.org/10.1016/j.fct.2006.03.003>
- Taboada, E., Fisher, P., Jara, R., Zúñiga, E., Gidekel, M., Cabrera, J. C., . . . Cabrera, G. (2010). Isolation and characterisation of pectic substances from murta (*Ugni molinae* Turcz) fruits. *Food Chemistry*, 123(3), 669-678. doi:<http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2010.05.030>
- Wink, M. (2008). Evolutionary Advantage and Molecular Modes of Action of Multi-Component Mixtures Used in Phytomedicine. *Current Drug Metabolism*, 9(10), 996-1009. doi:<http://dx.doi.org/10.2174/138920008786927794>
- Yamaguchi, Y., Yamada, K., Yoshikawa, N., Nakamura, K., Haginaka, J., & Kunitomo, M. (2006). Corosolic acid prevents oxidative stress, inflammation and hypertension in SHR/NDmcr-cp rats, a model of metabolic syndrome. *Life Sciences*, 79(26), 2474-2479. doi:<https://doi.org/10.1016/j.lfs.2006.08.007>

- Yin, Z., Zhang, W., Feng, F., Zhang, Y., & Kang, W. (2014).  $\alpha$ -Glucosidase inhibitors isolated from medicinal plants. *Food Science and Human Wellness*, 3(3–4), 136-174. doi:<http://dx.doi.org/10.1016/j.fshw.2014.11.003>
- Zhang, P., Zhang, X., Betz, J., Sicree, D. V., Shaw, J., & Nichols, G. (2009). Economic Impact of Diabetes. *IDF Atlas*, 1-28.
- Zhao, J., Zhou, X.-W., Chen, X.-B., & Wang, Q.-X. (2009).  $\alpha$ -glucosidase inhibitory constituents from *Toona sinensis*. *Chemistry of Natural Compounds*, 45(2), 244-246. doi:10.1007/s10600-009-9289-y
- Zimmet, P., Alberti, & Shaw, J. (2001). Global and societal implications of the diabetes epidemic. (0028-0836 (Print)).

## 11. ANEXOS

### Anexo 1: Identificación tentativa y análisis semicuantitativo de compuestos fenólicos presentes en los EAC de frutos de diferentes genotipos de *U. molinae*

#	TR (min)	Fragmentos (m/z)				Identificación tentativa	14-4	19-1	19-1	19-1	19-2	22-1	23-2	27-1	31-1	Referencias
								(2016)	(2017)	ha						
1	0,5	301	301			Ácido eláxico / Quercetina	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	100,0	0,0	0,0	0,0	a,b,c
2	2,6	191	172	126	85	Ácido quínico	0,0	100,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	a,b,d
3	2,9	533	191			Derivado del ácido caféico-O-hexósido	0,0	74,1	0,0	0,0	0,0	0,0	100,0	0,0	9,9	a
4	3,1	353	191	173	111	Ácido cafoilquínico	0,0	45,5	0,0	0,0	0,0	0,0	34,1	100,0	0,0	a,b,c
5	3,7	633	614	482	301	HHDP-galoil hexosa	0,0	40,2	15,8	0,0	0,0	100,0	27,1	30,1	10,0	a,b
6	3,7	191	173	129	111	Ácido cítrico	0,0	100,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	40,8	0,0	a,b,c
7	4,0	331	313	271	169	Galoilglucosa	0,0	3,8	0,0	0,0	0,0	100,0	2,0	0,0	0,0	a,d
8	4,1	516	173			Ácido dicafeoilquínico	0,0	100,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	a,b
9	4,8	353	173	111		Ácido cafeoilquínico	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	100,0	a,b,c
10	5,4	343	191	169		Ácido galoilquínico	0,0	100,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	a,b
11	6,3	633	614	482	301	HHDP-galoilhexosa	16,8	11,7	17,8	14,1	13,9	100,0	15,1	14,1	36,4	a,b
12	6,5	483	457	301		Tergalágico-O-glucósido	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	100,0	a
13	6,8	483	331	313	271	Digaloilglucosa	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	100,0	12,0	0,0	9,4	a,b
14	7,6	577	425	407	289	Procianidina dímero B	0,0	0,0	100,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	a
15	7,7	495	343	325	169	Ácido digaloilquínico	0,0	0,0	3,3	0,0	0,0	100,0	17,5	2,9	3,3	a,b,d
16	8,3	503	341	323		Ácido caféico dihexósido	100,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	a
17	8,5	533	191			Derivado del ácido caféico-O-hexósido	0,0	0,0	0,0	0,0	100,0	0,0	0,0	0,0	0,0	a
18	9,2	331	271	169		Galoilglucosa	100,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	a,d
19	9,6	495	343	325	169	Ácido digaloil quínico	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	100,0	0,0	0,0	0,0	a,b,d
20	10,0	353	173	111		Ácido cafeoilquínico	0,0	0,0	0,0	0,0	100,0	0,0	0,0	0,0	0,0	a,b,c
21	10,4	483	331	313	169	Digaloilglucosa	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	100,0	6,0	0,0	0,0	a,b
22	10,8	633	482	301	249	HHDP-galoilhexosa	15,2	0,0	0,0	0,0	65,4	100,0	18,6	0,0	0,0	a,b
23	11,4	495	343	325	169	Ácido digaloilquínico	0,0	6,0	0,0	0,0	0,0	100,0	22,3	0,7	6,1	a,b,d

24	11,5	635	465	423		Trigaloilglucosa	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	100,0	0,0	0,0	a,b,d
25	11,9	289	245	205	179	Epicatequina	0,0	0,0	100,0	0,0	0,0	11,5	0,0	0,0	0,0	a,b,c
26	12,5	633	614	482	301	HHDP-galoilhexosa	19,2	43,3	0,0	0,0	0,0	100,0	0,0	18,9	85,3	a,b
27	13,6	448	285			Taxifolina-O-ramnósido	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	100,0	a,b
28	13,7	453	409	313	285	Digaloilpentosa	0,0	0,0	100,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	a
29	13,9	331	271			Galoilglucosa	16,7	0,0	0,0	100,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	a
30	14,2	635	483	465	423	Trigaloilglucosa	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	100,0	1,1	0,0	19,1	a,b,d
31	14,5	631	479	435	317	Miricetina-O-galoil hexosa	0,0	0,0	2,0	0,0	0,0	100,0	25,2	0,0	34,7	a,d
32	15,0	633	301	249		HHDP-galoilhexosa	46,7	0,0	0,0	56,1	100,0	0,0	0,0	2,7	0,0	a,b
33	15,1	479	331	317		Miricetina-O-hexósido	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	20,0	100,0	0,0	82,8	a,d
34	15,7	483	331	169		Digaloilglucosa	100,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	a,b
35	16,0	402	269			Bencilalcohol hexosa pentosa	0,0	0,0	18,9	0,0	0,0	100,0	0,0	0,0	0,0	a
36	16,4	495	343	325	191	Ácido digaloilquínico	55,6	0,0	0,0	100,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	a,b,d
37	16,6	479	317			Miricetina-O-hexósido	0,0	0,0	33,5	0,0	0,0	100,0	0,0	0,0	83,4	a,d
38	16,6	448	374	285		Luteolina-O-hexósido / Canferol-O-hexósido	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	100,0	34,3	0,0	0,0	a,d
39	16,6	448	285			Taxifolina-O-ramnósido	0,0	0,0	100,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	a,b
40	16,7	578	425	407		Procianidina dímero B	100,0	0,0	51,9	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	a
41	17,2	633	421	301		HHDP-galoilhexosa	100,0	3,7	0,0	51,5	96,1	0,0	0,0	0,0	0,0	a,b
42	17,5	631	479	317		Miricetina-O- galoilhexósido	0,0	0,0	13,1	0,0	0,0	100,0	11,5	0,0	0,0	a,d
43	17,5	477	317	301		Quercetina-O- glucurónido	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	100,0	0,0	0,0	a,d
44	17,6	449	316			Miricetina-O-pentósido	0,0	0,0	13,7	0,0	0,0	100,0	1,4	0,0	0,0	a,d
45	17,7	615	463	301		Quercetina-O-galoil hexósido	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	100,0	a,d
46	17,8	625	463	301		Quercetina-O- dihexósido	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	100,0	a,d
47	17,9	463	301			Quercetina-O-hexósido	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	100,0	32,2	0,0	0,0	a,d
48	18,1	433	301			Quercetina-O-pentósido	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	100,0	a,d
49	18,9	495	343	325		Ácido digaloilquínico	0,0	0,0	0,0	15,8	100,0	0,0	0,0	0,2	0,0	a,b,d
50	19,1	463	317			Miricetina-O-ramnósido	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	1,3	0,0	100,0	a,c,d

51	19,2	483	331	169	Digaloilglucosa	72,3	0,0	0,0	59,1	100,0	0,0	0,0	0,0	0,0	a,b	
52	19,4	479	317		Miricetina-O-hexósido	0,0	0,0	48,5	0,0	0,0	90,8	100,0	0,0	0,0	a,d	
53	19,4	301	300		Ácido elágico / Quercetina	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	100,0	a,b,c	
54	19,5	633	301	249	HHDP-galoil hexosa	0,0	14,3	0,0	0,0	100,0	0,0	0,0	0,0	0,0	a,b	
55	19,7	477	301		Quercetina-O- glucurónido	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	100,0	a,c,d	
56	19,8	463	301		Quercetina-O-hexósido	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	100,0	a,d	
57	19,8	381	301	169	Quercetina-O-sulfato	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	100,0	0,0	0,0	a	
58	20,1	578	425		Procianidina dímero B	100,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	a	
59	20,3	615	463	301	Quercetina-O-galoil hexósido	0,0	0,0	19,7	0,0	0,0	100,0	25,8	0,0	0,0	a,d	
60	20,4	448	285		Taxifolina-O-ramnósido	0,0	0,0	0,0	0,0	100,0	0,0	0,0	0,0	0,0	a,b	
61	20,4	625	463	301	Quercetina-O- dihexósido	28,6	0,0	45,5	0,0	0,0	0,0	100,0	0,0	0,0	a,d	
62	20,6	599	463	301	Quercetina-hexosa- ácido protocatéquico	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	100,0	a	
63	20,7	448	285		Luteolina-O-hexósido / Canferol-O-hexósido	100,0	0,0	0,0	4,5	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	a,d	
64	21,2	633	464	482	301	HHDP-galoil hexosa	100,0	4,6	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	4,7	0,0	a,b
65	21,2	433	301		Quercetina-O-pentósido	0,0	0,0	77,1	0,0	0,0	40,2	29,8	0,0	100,0	a,d	
66	21,2	449	316	179	Miricetina-O-pentósido	0,0	0,0	34,3	0,0	0,0	100,0	20,6	0,0	0,0	a,d	
67	21,3	635	465	301	Trigaloilglucosa	100,0	0,0	0,0	34,1	24,9	0,0	0,0	0,0	0,0	a,b,d	
68	21,7	463	317		Miricetina-O-ramnósido	0,0	0,0	9,7	0,0	0,0	0,0	100,0	0,0	0,0	a,c,d	
69	21,7	516	353	191	Ácido dicafeoilquínico	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	100,0	a,b	
70	22,2	447	301		Quercetina-O- ramnósido	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	100,0	a,c,d	
71	22,3	477	314	285	163	Isoramnetina-O- glucósido	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	100,0	a
72	22,3	301	301		Ácido elágico / Quercetina	0,0	0,0	44,2	0,0	0,0	0,0	100,0	0,0	0,0	a,b,c	
73	22,5	631	479		Miricetina-O- galoilhexósido	0,0	0,0	0,0	100,0	89,2	0,0	0,0	0,0	0,0	a,d	
74	22,6	463	301		Quercetina-O-hexósido	0,6	0,0	100,0	0,0	0,0	30,1	34,2	0,0	0,0	a,d	

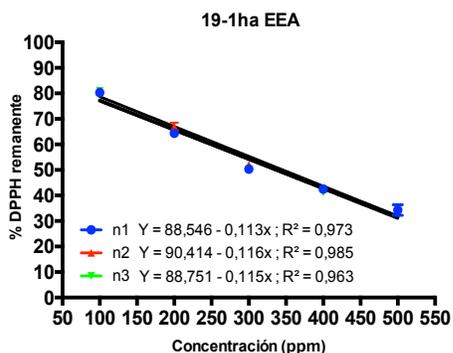
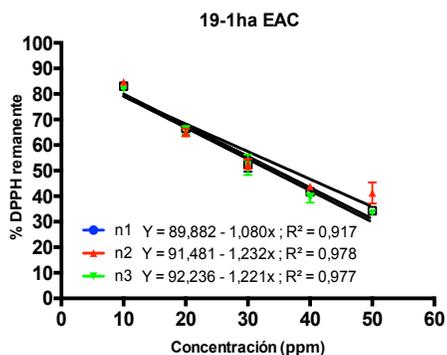
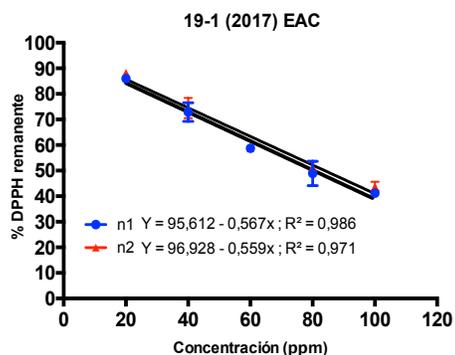
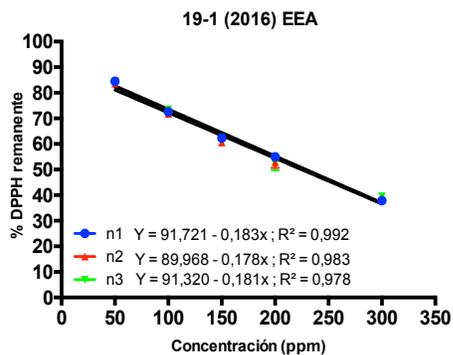
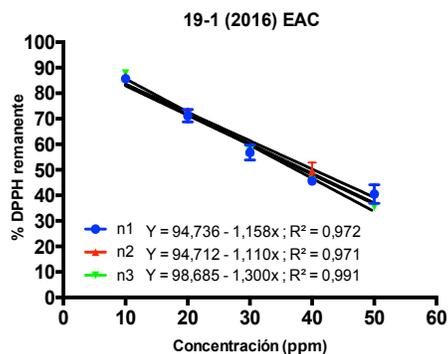
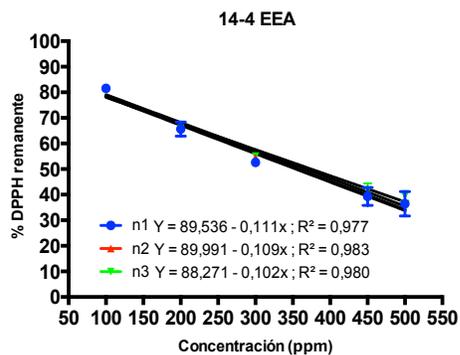
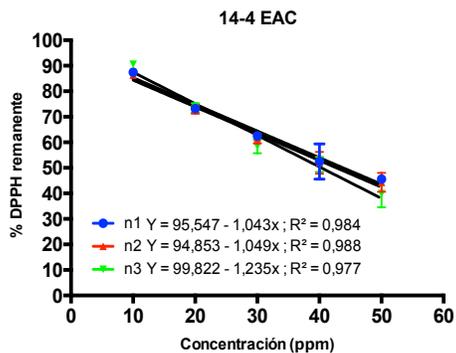
75	22,7	479	317		Miricetina-O-hexósido	72,8	0,0	0,0	100,0	63,4	0,0	0,0	0,0	0,0	a,d	
76	22,8	495	343	192	169	Ácido digaloiíquínico	0,0	100,0	0,0	0,0	0,0	0,0	47,2	0,0	a,b,d	
77	22,8	615	463	301		Quercetina-O-galoilhexósido	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	100,0	a,d	
78	22,9	477	301			Quercetina-O-glucurónido	0,0	0,0	54,5	0,0	0,0	0,0	100,0	0,0	a,d	
79	23,5	402	269	160		Bencilalcohol hexosa pentosa	0,0	0,0	0,0	100,0	0,0	0,0	0,0	0,0	a,d	
80	23,8	599	463	301		Quercetina-hexosa-ácido protocatéquico	0,0	0,0	34,0	0,0	0,0	0,0	100,0	0,0	a	
81	23,9	449	316			Miricetina-O-pentósido	0,0	0,0	0,0	0,0	100,0	0,0	0,0	0,0	a,d	
82	23,9	453	313			Digaloilpentosa	100,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	a	
83	24,1	631	479	317		Miricetina-O-galoilhexósido	100,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	a,d	
84	24,4	625	463	301		Quercetina-O-dihexósido	13,3	0,0	0,0	100,0	89,1	0,0	0,0	0,0	29,5	a,d
85	25,0	635	465	301		Trigaloilglucosa	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	100,0	0,0	a,b,d
86	25,1	448	327	285		Luteolina-O-hexósido / Canferol-O-hexósido	0,0	0,0	100,0	0,0	0,0	0,0	55,4	0,0	0,0	a,d
87	25,2	479	317			Miricetina-O-hexósido	38,4	0,0	0,0	43,9	100,0	0,0	0,0	0,0	0,0	a,d
88	25,3	615	463	301		Quercetina-O-galoilhexósido	72,0	0,0	0,0	100,0	92,1	0,0	0,6	0,0	0,0	a,d
89	25,3	463	301			Quercetina-O-hexósido	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	100,0	0,0	0,0	a,d
90	25,7	433	301			Quercetina-O-pentósido	6,4	0,0	100,0	11,3	9,6	0,0	9,8	0,0	0,0	a,d
91	25,7	447	301			Quercetina-O-ramnósido	0,0	0,0	2,6	0,0	0,0	0,0	100,0	0,0	0,0	a,d
						Luteolina-O-rutinósido /Canferol-O-rutinósido /										
92	25,8	593	447	285		Canferol-O-ramnosilhexósido / Canferol-O-cumaroilglucósido	0,0	100,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	a,b
93	26,0	495	343	325	169	Ácido digaloiíquínico	0,0	100,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	37,9	0,0	a,b,d
94	26,0	639	463	301		Isoramnetina-O-	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	100,0	a

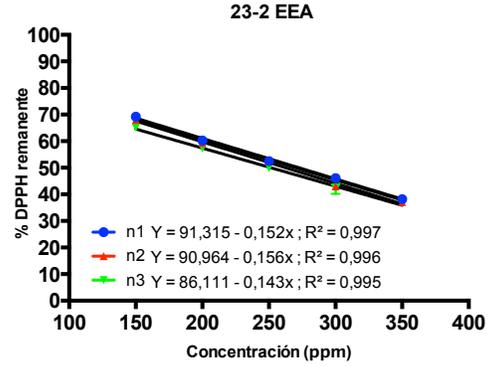
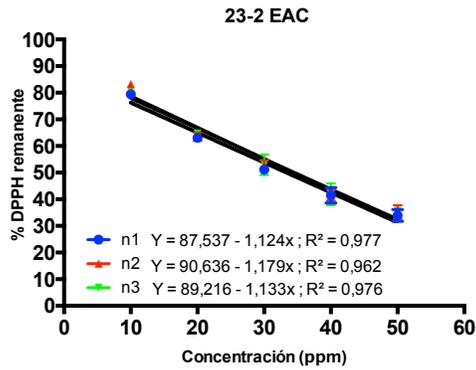
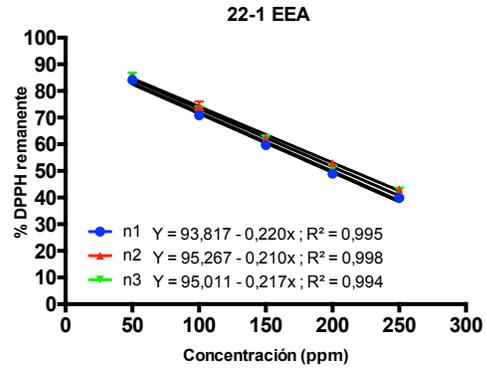
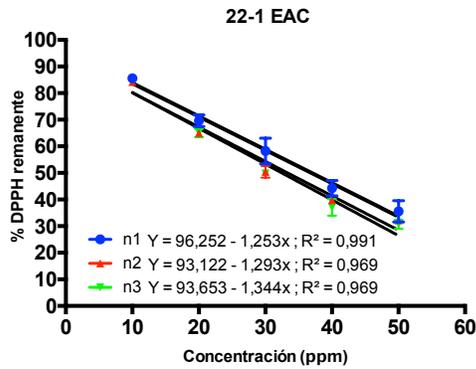
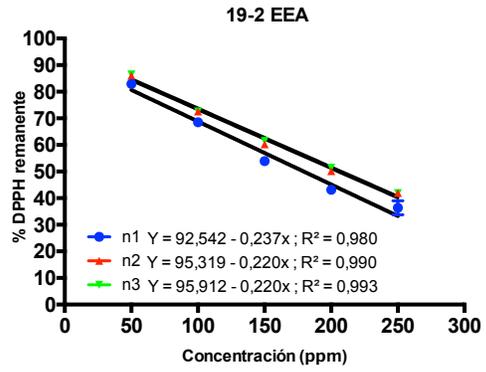
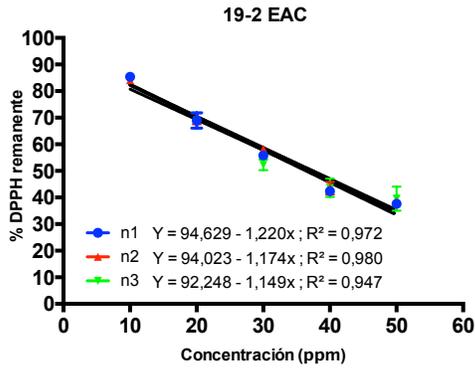


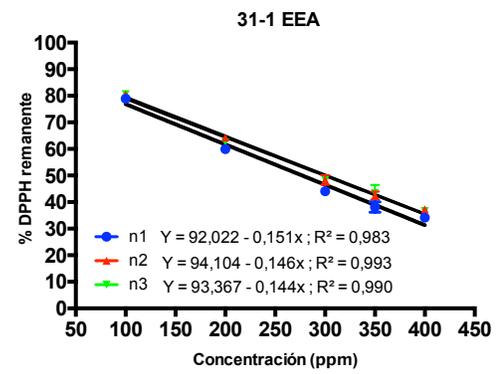
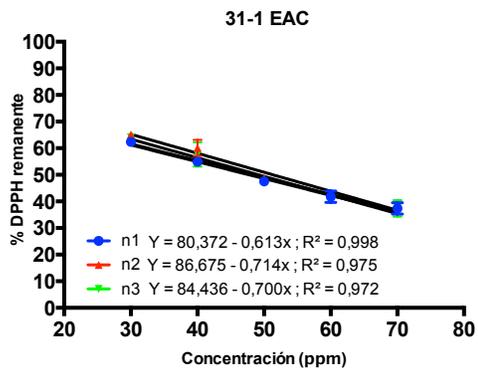
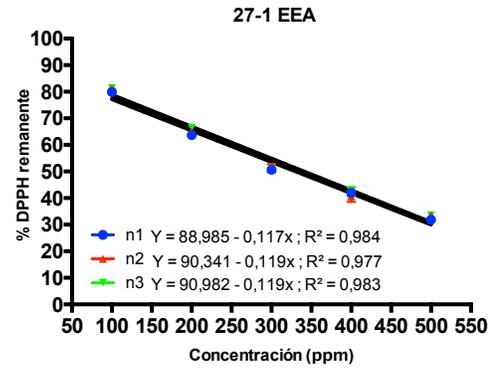
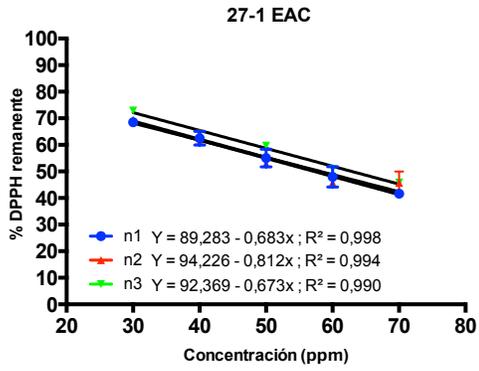
					deoxihexósido										
114	30,8	625	463	301	Quercetina-O-dihexósido	0,0	0,0	0,0	100,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	a,d
115	30,9	639	463	301	Isoramnetina-O-dihexósido	0,0	0,0	34,9	0,0	0,0	0,0	100,0	0,0	0,0	a
116	31,7	609	463	301	Quercetina-O-ramnosilhexósido / Quercetina-O-cumaroilhexósido	0,0	0,0	100,0	0,0	36,6	0,0	22,1	0,0	0,0	a,d
117	32,0	479	317		Miricetina-O-hexósido	0,0	48,9	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	100,0	0,0	a,d
					Luteolina-O-rutinósido /										
118	32,1	593	285		Canferol-O-cumaroilglucósido / Canferol-O-ramnosilhexósido	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	100,0	0,0	0,0	a,b
119	32,2	453	313		Digaloilpentosa	0,0	100,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	a
120	32,2	631	479	317	Miricetina-O-galoilhexósido	0,0	100,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	85,6	0,0	a,d
121	32,5	491	315		Isoramnetina-O-glucurónido	0,0	0,0	0,0	0,0	100,0	0,0	0,0	0,0	0,0	a,c
122	33,8	639	463	301	Isoramnetina-O-dihexósido	0,0	0,0	0,0	97,6	100,0	0,0	0,0	0,0	0,0	a
123	33,9	609	463	301	Quercetina-O-ramnosilhexósido	0,0	0,0	0,0	100,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	a
124	34,1	615	463	301	Quercetina-O-galoilhexósido	0,0	100,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	94,6	0,0	a,d
125	34,1	625	463	301	Quercetina-O-dihexósido	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	100,0	0,0	a,d
126	34,8	449	316		Miricetina-O-pentósido	0,0	100,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	a,d
127	34,9	463	317		Miricetina-O-ramnósido	0,0	100,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	a,d
128	35,2	645	479	317	Galoi-metil-miricetin hexósido	0,0	0,0	0,0	100,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	a,d
129	35,2	477	301		Quercetina-O-glucurónido	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	100,0	0,0	a,d

130	35,4	463	301	Quercetina-O-hexósido	0,0	30,4	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	100,0	0,0	a,d	
131	35,5	433	301	Quercetina-O-pentósido	0,0	100,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	10,7	0,0	a,d	
132	35,9	301	300	Ácido elágico / Quercetina	0,0	100,0	0,0	0,0	1,4	0,0	0,0	47,7	0,0	a,b,c,d	
133	36,0	593	447	285	Canferol-O-rutinósido / Canferol-O- ramnosilhexósido	0,0	0,0	0,0	100,0	0,0	0,0	0,0	0,0	a,b	
134	36,1	599	463	301	Quercetina-hexosa- ácido protocatéquico	0,0	100,0	0,0	0,0	0,0	0,0	59,5	0,0	a	
135	36,8	633	464	301	HHDP-galoil hexosa	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	100,0	0,0	a,b	
136	36,9	447	301	Quercetina-O- ramnósido	0,0	100,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	a,d	
137	36,9	623	315	Isoramnetina-O- rutinósido	0,0	0,0	0,0	100,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	a,b	
138	37,5	614	463	317	301	Miricetina-O-galoil deoxihexósido	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	100,0	0,0	a
139	38,0	625	463	301	Quercetina-O- dihexósido	0,0	100,0	0,0	0,0	0,0	0,0	21,4	0,0	a,d	
140	38,4	639	583	493	331	Metoxiquercetina-O- hexósido	0,0	100,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	a
141	40,1	610	463	301	Quercetina-O- ramnosilhexósido / Quercetina-O- cumaroilhexósido	0,0	100,0	0,0	0,0	0,0	0,0	74,2	0,0	a,d	
142	40,3	639	463	301	Isoramnetina-O- dihexósido	0,0	100,0	0,0	0,0	0,0	0,0	55,4	0,0	a	
143	41,3	593	447	285	Canferol-O- cumaroilglucósido	0,0	100,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	a,b,c	
144	41,6	623	477	315	Isoramnetina-O- rutinósido	0,0	100,0	0,0	0,0	0,0	0,0	67,3	0,0	a,c	
145	41,8	301	256	179	151	Quercetina	89,1	75,5	0,0	0,0	0,0	0,0	100,0	0,0	a,b,c
145	42,5	331	316	Miricetina metileter / Quercetagetina metileter	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	100,0	0,0	a	

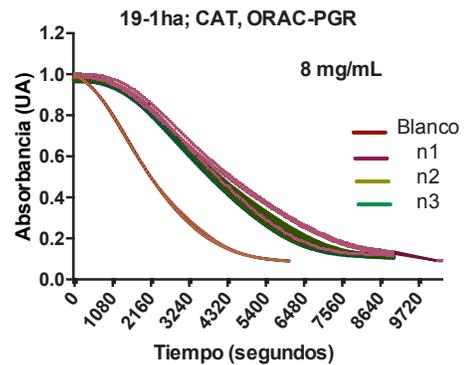
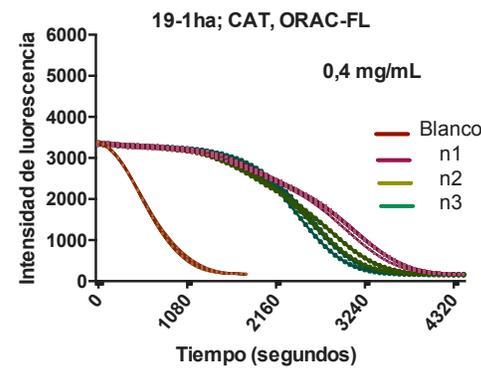
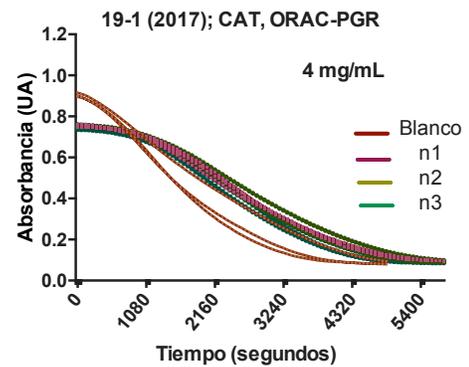
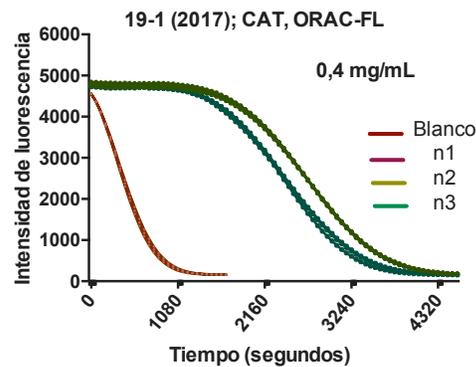
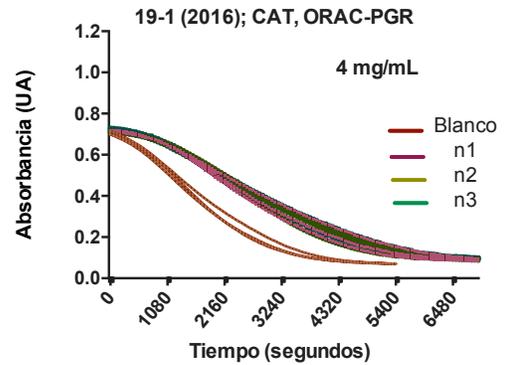
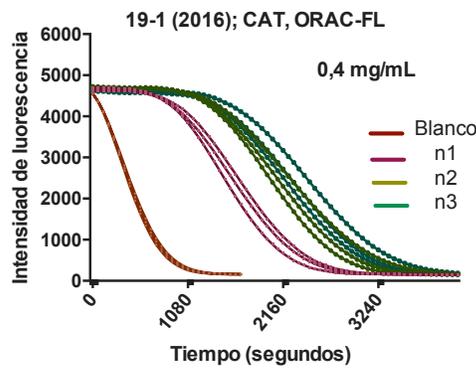
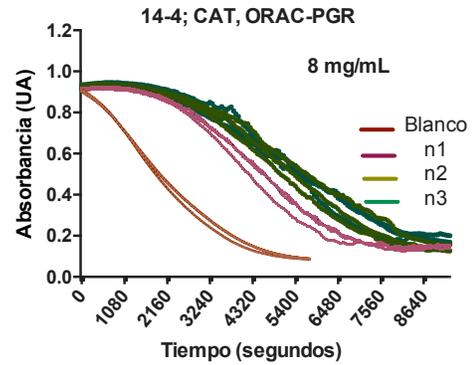
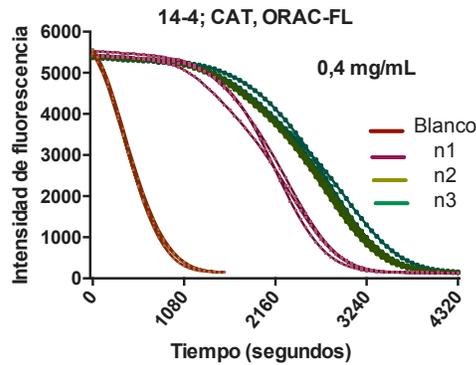
## Anexo 2: Curvas para determinación de CE<sub>50</sub> frente a radical DPPH

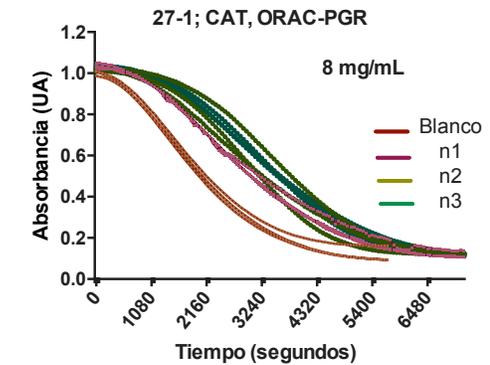
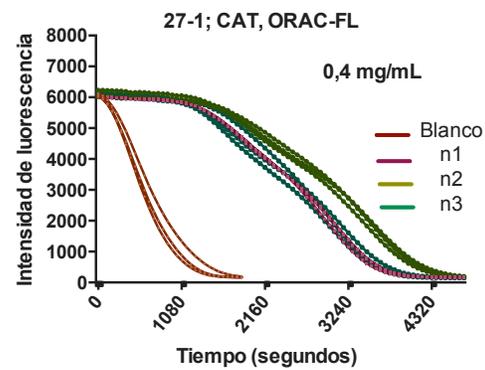
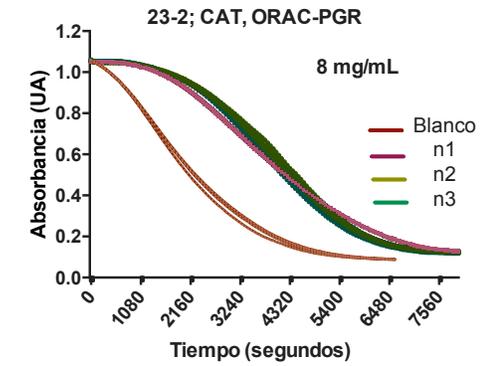
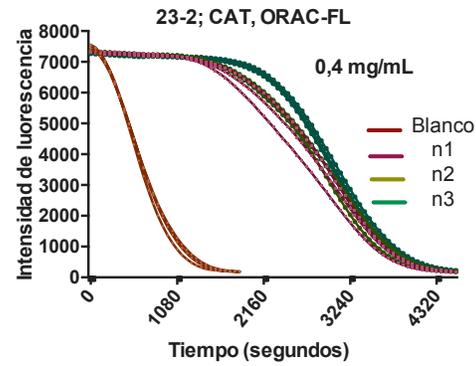
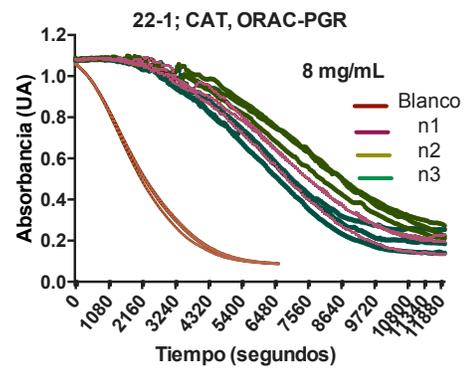
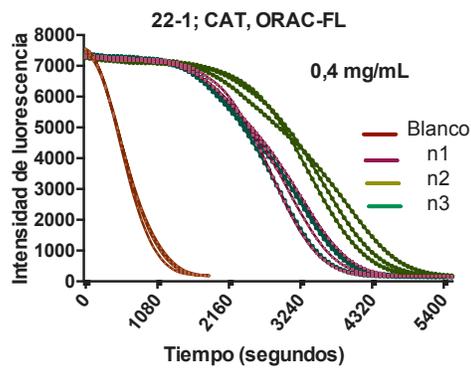
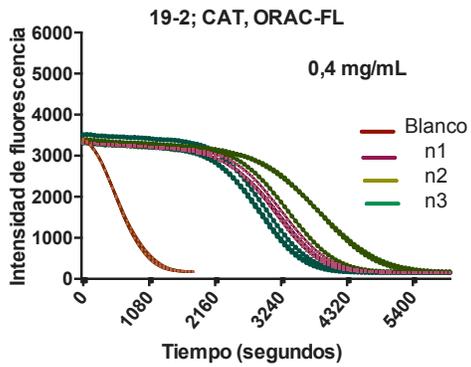


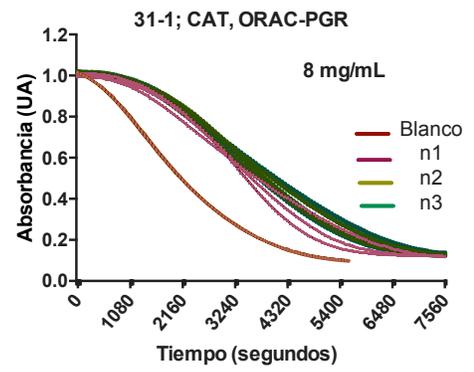
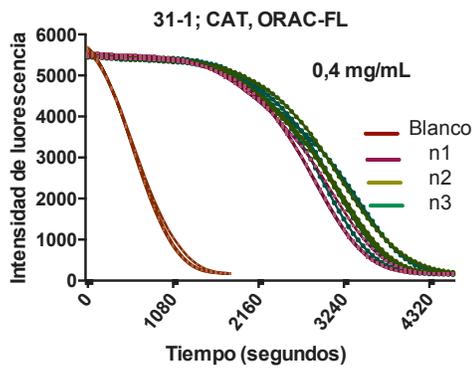




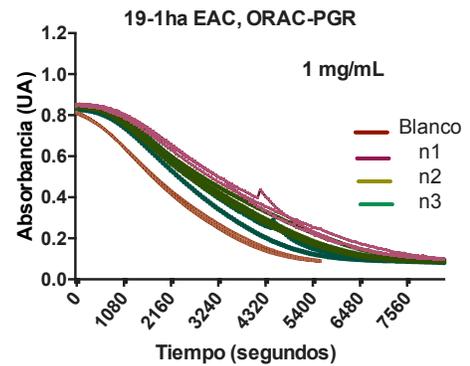
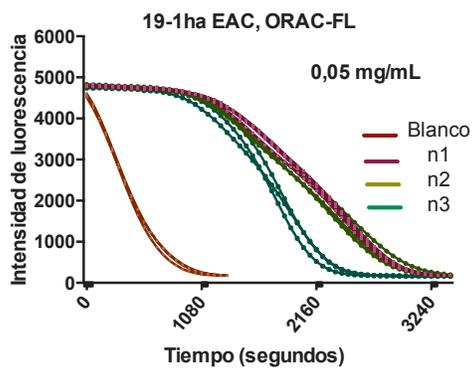
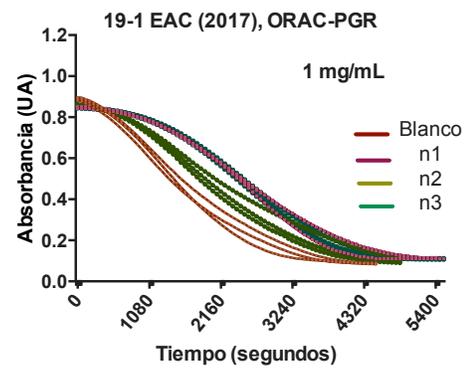
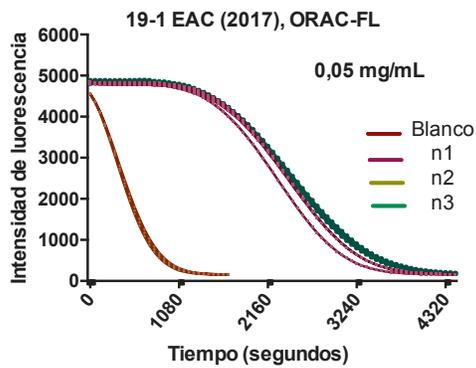
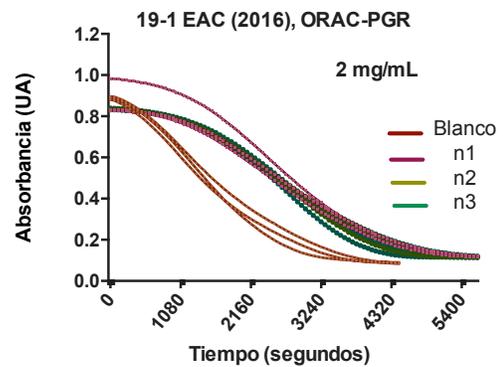
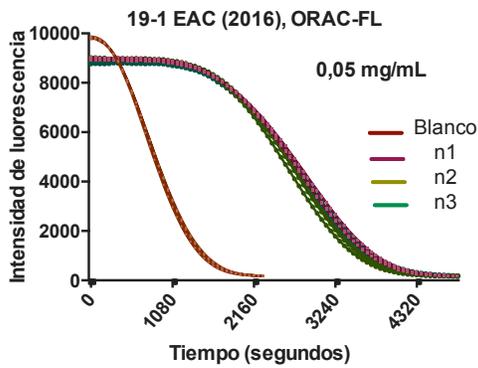
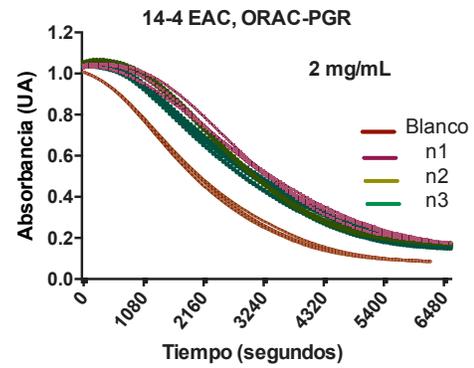
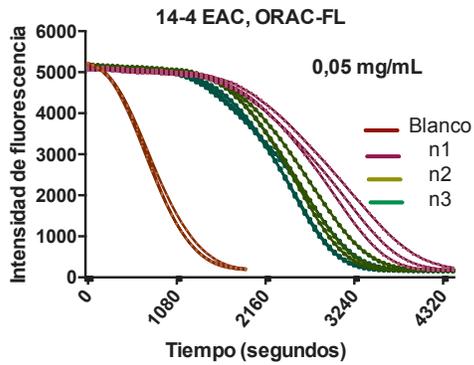
### Anexo 3: Curvas de decaimiento de fluorescencia para ORAC-FL y de absorbancia de ORAC-PGR para Capacidad Antioxidante Total (CAT)

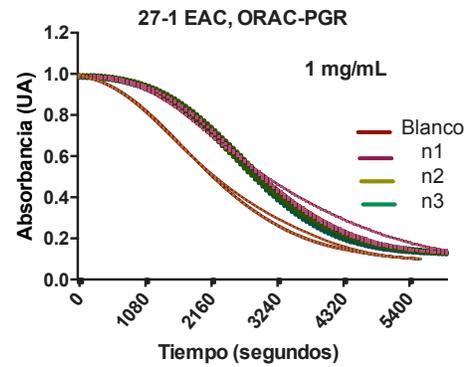
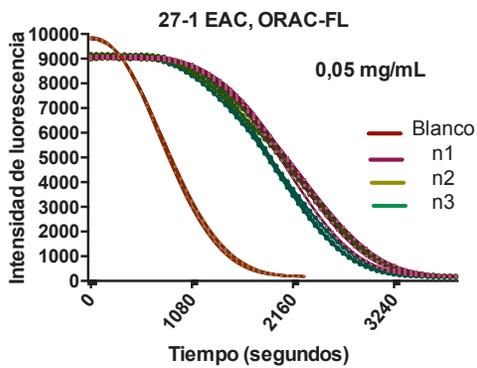
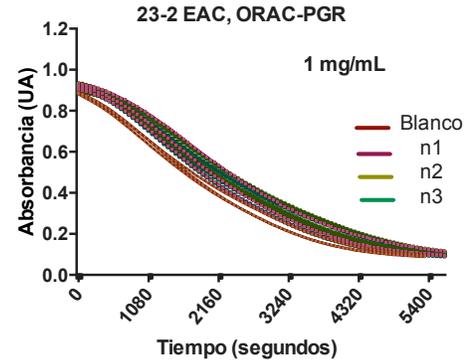
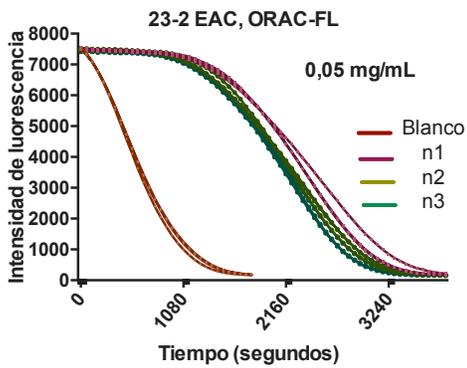
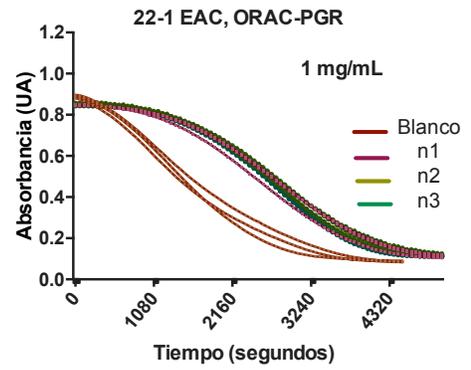
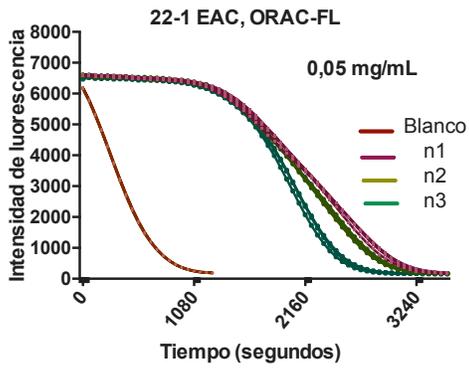
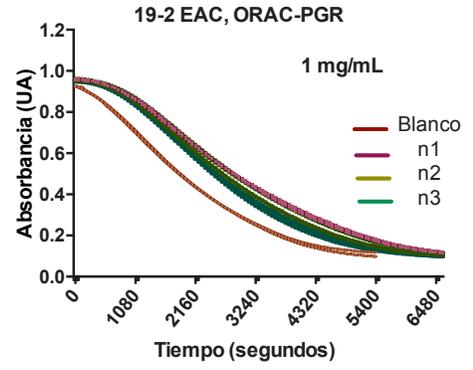
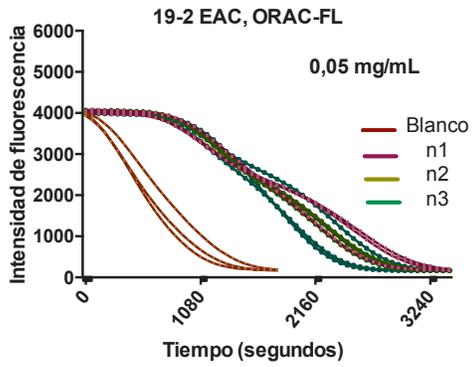


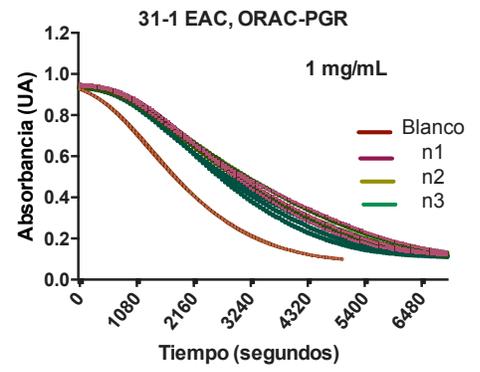
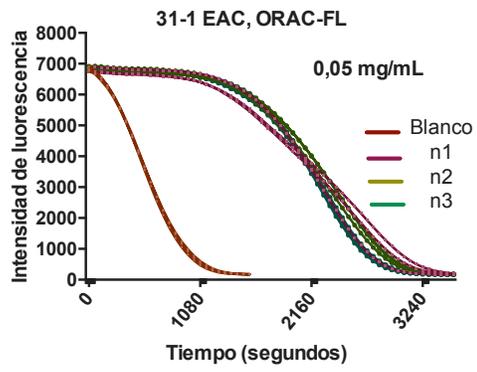




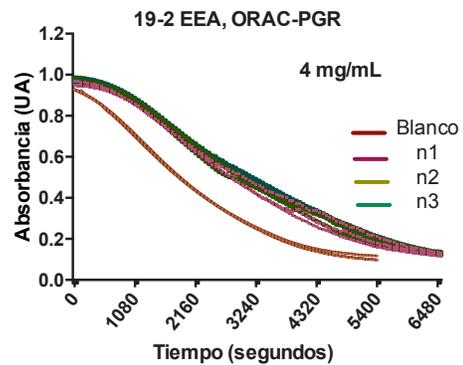
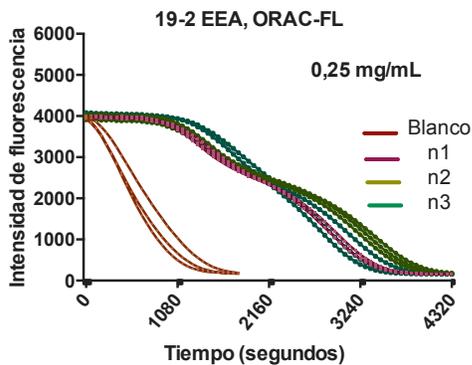
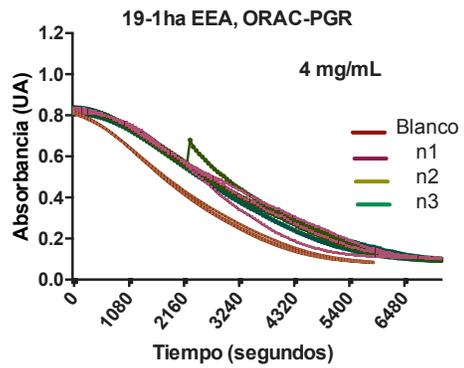
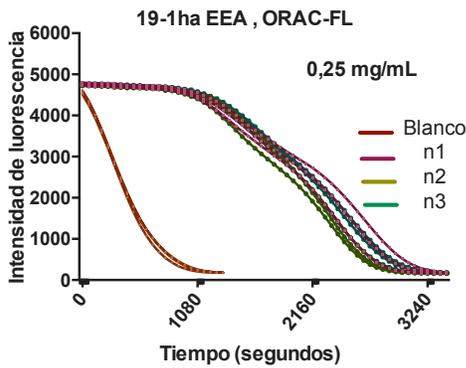
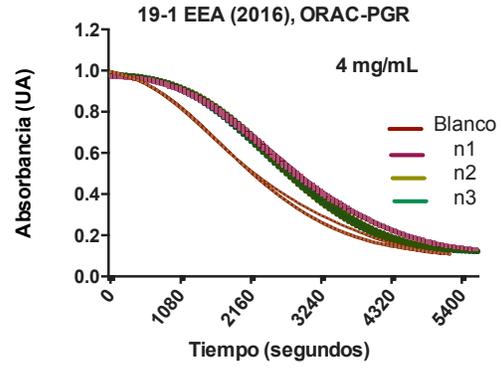
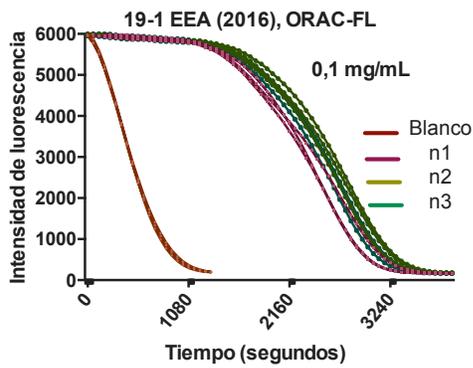
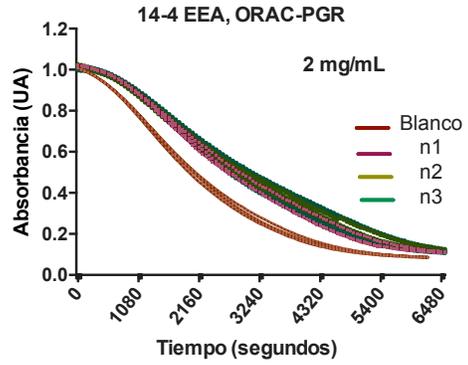
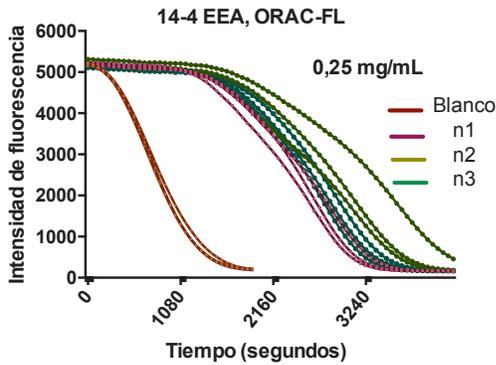
## Anexo 4: Curvas de decaimiento de fluorescencia para ORAC-FL y de absorbancia de ORAC-PGR para EACs

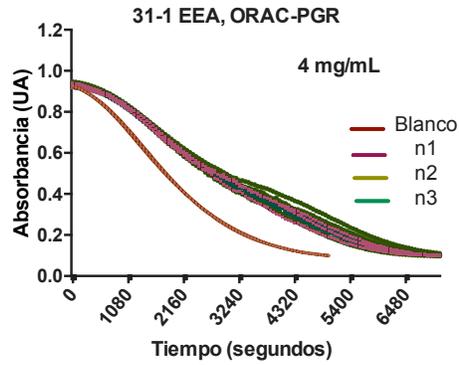
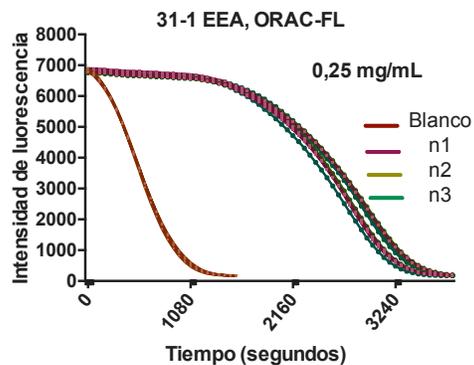
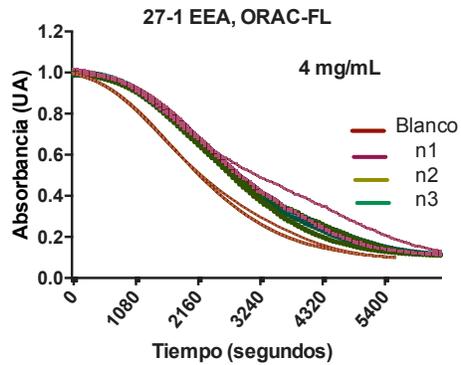
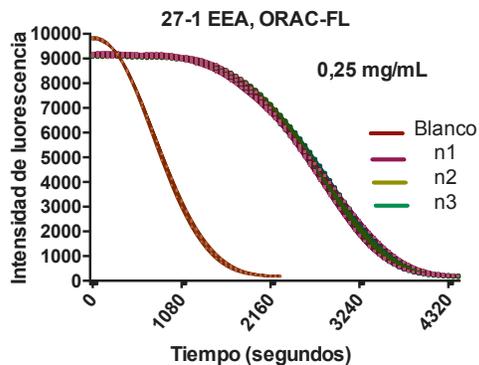
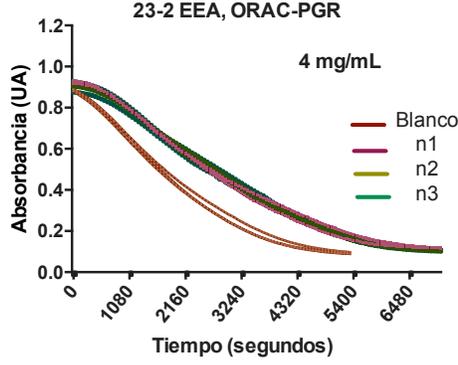
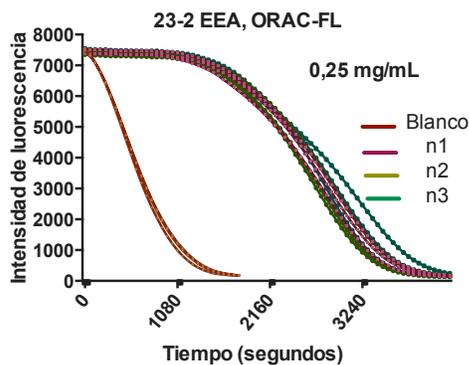
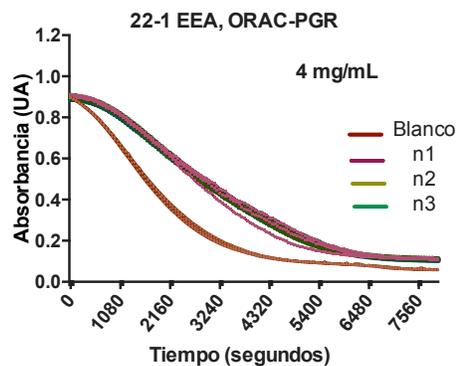
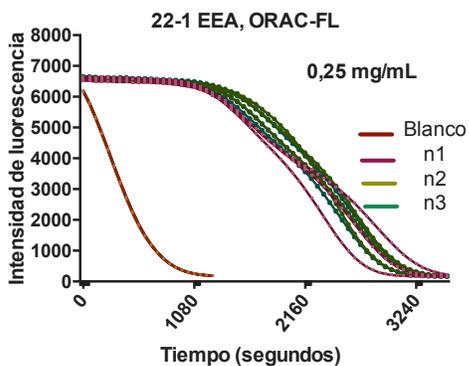




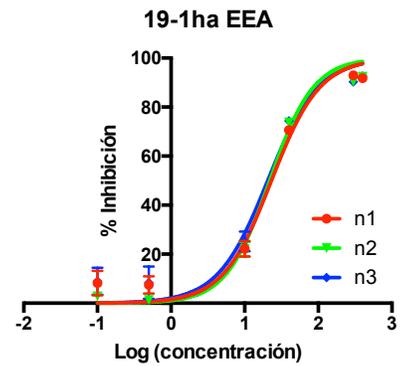
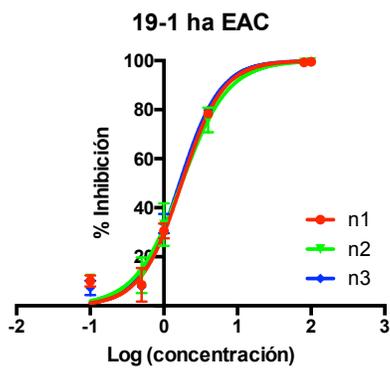
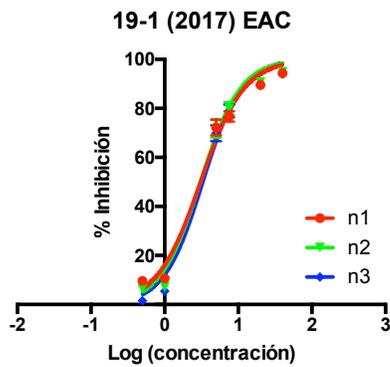
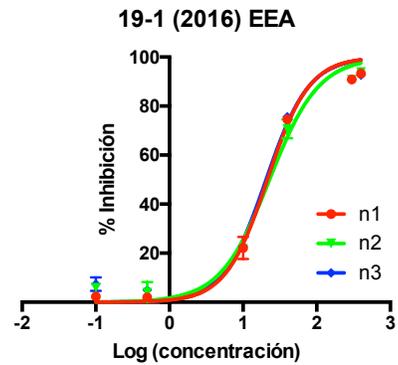
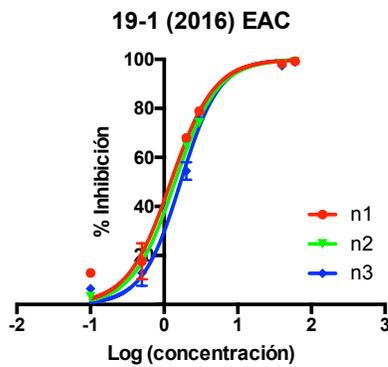
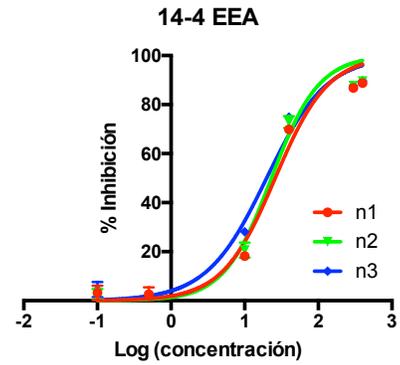
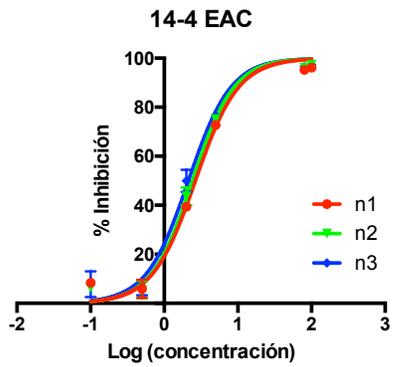


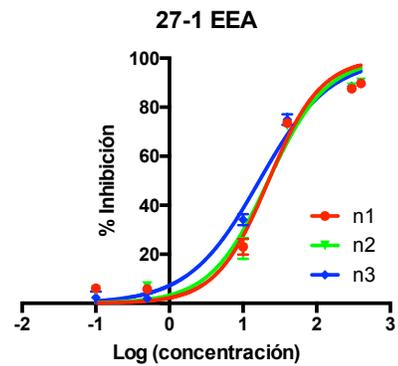
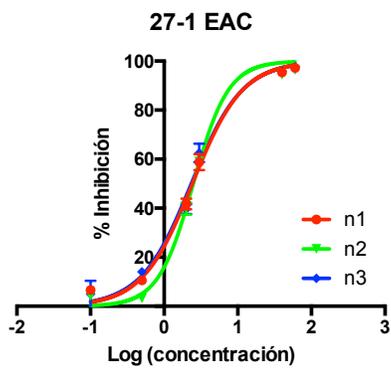
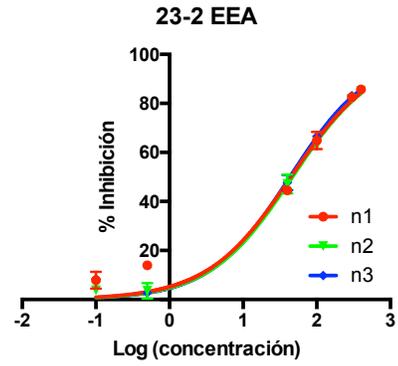
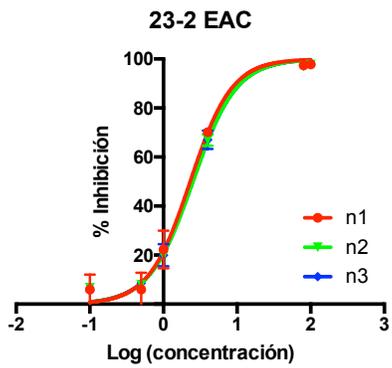
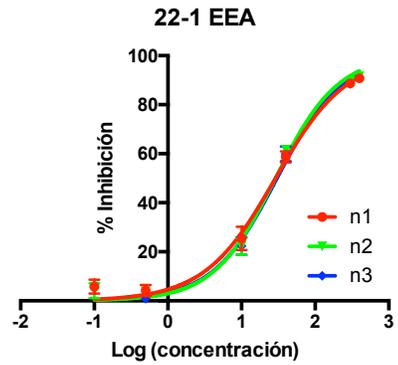
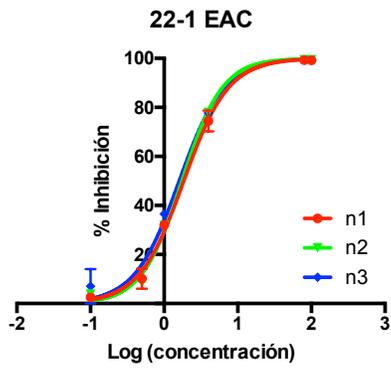
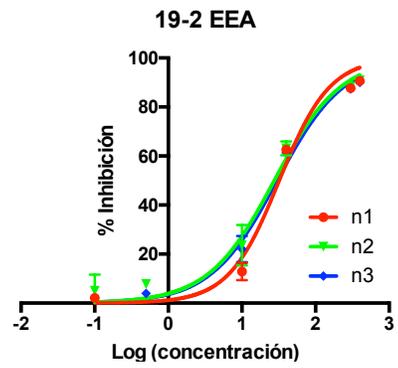
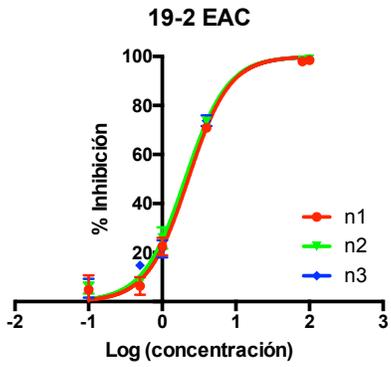
## Anexo 5: Curvas de decaimiento de fluorescencia para ORAC-FL y de absorbancia de ORAC-PGR para EEAs

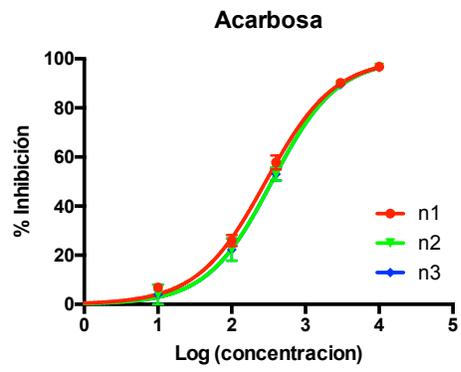
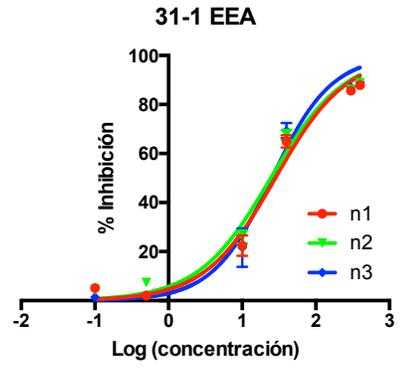
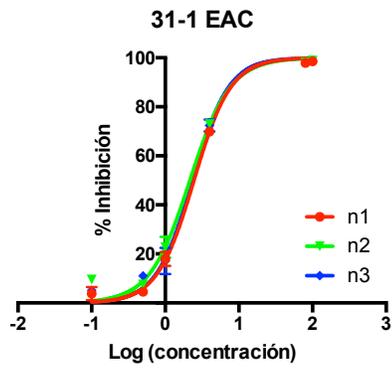




## Anexo 6: Curvas de inhibición de la actividad de $\alpha$ -glucosidasa para los EEAs y EACs







**Anexo 7: Curvas de inhibición de la actividad de glicógeno fosforilasa A para los EEAs y EACs**

