

Universidad de Chile

Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas



Evaluación del efecto de extractos obtenidos desde frutos de *Ugni molinae* Turcz. sobre la agregación proteica asociada a enfermedades neurodegenerativas

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

Por:

Rodrigo Nicolás Pérez Arancibia

Directores de tesis

Dra. Carla Delporte Vergara

Dr. Claudio Hetz

Co-tutor

Dr. René Vidal

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

RODRIGO NICOLÁS PÉREZ ARANCIBIA

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 _____

Directores de Tesis:

Dra. Carla Delporte

Dr. Claudio Hetz

Co-director de Tesis:

Dr. Rene Vidal

Comisión Evaluadora de Tesis:

Dr. Marcelo Kogan

Dra. Alejandra Alvarez

Dr. Mario Herrera Marschitz

Dr. Hernan Pesoa

Financiamiento

La investigación de esta tesis fue financiada por:

Beca CONICYT de Doctorado Nacional N° 2115076

FONDECYT N° 1130155

AGRADECIMIENTOS

Al finalizar esta etapa quisiera agradecer, en primer lugar, a mi familia: a mis padres Claudia y Marcelo por entregarme las herramientas que me permitieron llegar hasta aquí, a mis hermanos Claudia y Daniel, que más que hermanos se han convertido en grandes amigos, a mi cuñado Blasco que se ha convertido en uno más de la familia, a mi abuela Elvira por sus incansables muestras de cariño, y a mi pequeña sobrina Victoria por todos esos momentos de juegos y risas. Sin su constante e incondicional preocupación, cariño, y apoyo, nada de esto hubiera sido posible. A pesar de todas las dificultades y malos pronósticos, siempre nos hemos mantenido unidos y estoy seguro de que eso nunca va a cambiar.

A Paulina, por hacer mis días más felices, por darme ánimo cuando todo parecía andar mal, por creer en mi y seguir a mi lado a pesar de todo, por los viajes y los vinos, por todos sus consejos y, por supuesto, por el amor que me entrega día a día. También agradezco a toda la familia Troncoso-Escudero, por que desde el 1er día me hicieron sentir como uno más y por las constantes muestras de cariño que no solo iban dirigidas hacia mi, sino que también hacia toda mi familia.

A mis tutores, la Dra. Carla Delporte, el Dr. Claudio Hetz, y el Dr. Rene Vidal, porque a través de estos años no solo me ayudaron a no perder el rumbo, sino que también pudimos compartir más allá de la vida académica. Cada uno jugó un rol esencial para poder concluir este trabajo de la mejor manera y todos me ayudaron a crecer como científico y como persona. Extiendo los agradecimientos a los integrantes de sus laboratorios, entre los cuales también he ido ganando grandes amigos y compañeros: A Marcelo, Pauli Torres, Alexis, Pepe, Celia, Philippe, Alfredo, Denisse, Marisol, Sandra, Ale, y a todos con los que compartimos en el mesón o fuera del laboratorio.

A mis más queridos amigos: Sofía, Alvarito, Monin, Sere, Renatto, y Diego por estar siempre presentes y preocupados del avance de este trabajo, por los innumerables momentos juntos, por las conversaciones serias y las no tanto, por el cariño y por las risas. Sobre todo por las risas.

A todos y cada uno de los que fueron parte de esto: GRACIAS TOTALES!

ÍNDICE DE CONTENIDOS	Página
FINANCIAMIENTO	IV
AGRADECIMIENTOS	V
ÍNDICE DE CONTENIDOS	VI
ABREVIATURAS	X
ÍNDICE DE TABLAS	XIII
ÍNDICE DE FIGURAS	XIV
RESUMEN	XVII
ABSTRACT	XIX
I. INTRODUCCIÓN	1
1. Productos Naturales y el descubrimiento de fármacos	1
2. Compuestos Polifenólicos	2
3. La Murtilla	4
3.1. Composición química y propiedades farmacológicas de la murtilla	5
4. Alteraciones de la homeostasis proteica y su implicancia en la función del cerebro	7
5. Polifenoles y sus efectos neuroprotectores	11
II. HIPÓTESIS	14
III. OBJETIVOS	14
1. Objetivo general	14
2. Objetivos específicos	14
IV. MATERIALES Y MÉTODOS	15
1. Materiales	15
1.1. Reactivos	15
1.2. Material Vegetal	16
2. Metodología	17
2.1. Recolección del material vegetal	17
2.2. Obtención de los extractos secos y libres de solvente de frutos de diferentes genotipos de murtilla	18

2.3. Evaluación comparativa del contenido de fenoles totales	19
2.4. Determinación del perfil de fenoles presentes en los extractos secos mediante cromatografía en capa fina	20
2.5. Análisis de componentes principales del perfil de compuestos presentes en los EACs y EEAs obtenido por CCF de alta resolución	22
2.5.1. Análisis del perfil de compuestos fenólicos en los EACs y EEAs por CCF de alta resolución	22
2.5.2. Extracción de los datos obtenidos por CCF de alta resolución con la aplicación rTLC para análisis de componentes principales	24
2.6. Análisis del perfil de compuestos fenólicos por cromatografía líquida de alta eficiencia acoplada a un arreglo de diodos (CLAE-DAD)	26
2.7. Estudios Celulares	27
2.7.1. Cultivo Celular	27
2.7.2. Análisis de la formación de inclusiones proteicas intracelulares en un modelo de transfección transiente utilizando una plataforma de análisis a gran escala	27
2.7.3. Cálculo del Factor Z'	28
2.7.4. Análisis de la viabilidad celular en presencia de los EACs y EEAs	29
2.7.5. Análisis del efecto de los EACs y EEAs obtenidos a partir de los frutos de distintos genotipos de murtila de reducir el número de inclusiones de polyQ ₇₉ -EGFP	29
2.7.6. Validación del efecto de los extractos seleccionados de reducir los niveles de especies de alto peso molecular de polyQ ₇₉ y mHTT _{Q85}	30
2.7.6.1. Análisis por Western Blot	30
2.8. Análisis por CLAE acoplada a espectrometría de masas de los extractos seleccionados	31
2.8.1. Identificación tentativa a 280, 360, y 520nm de los compuestos fenólicos presentes en los extractos seleccionados	31
2.8.2. Semicuantificación relativa de los compuestos fenólicos tentativamente identificados en los extractos seleccionados	32
2.9. Análisis estadístico	32
V. RESULTADOS	34
1. Rendimiento del proceso de extracción	34
2. Análisis del contenido de fenoles totales	35
2.1. Curva de calibración de ácido gálico	35
2.2. Análisis del contenido de fenoles totales de los EACs	36
2.3. Análisis del contenido de fenoles totales de los EEAs	38
3. Perfil fenólico mediante CCF de los extractos de frutos de murtila	41

4.	Análisis del perfil de compuestos presentes en los EACs y EEAs mediante CCF de alta resolución y análisis de componentes principales	45
4.1.	Análisis del perfil de compuestos fenólicos por CCF de alta resolución	45
4.2.	Análisis de componentes principales de los resultados obtenidos por CCF de alta resolución	49
5.	Análisis del perfil fenólico de los extractos CLAE-DAD	52
6.	Estudios Celulares	59
6.1.	Análisis de la agregación proteica en un modelo de agregación de poliglutamina	59
6.2.	Análisis de la toxicidad de los EACs y EEAs de frutos de distintos genotipos de murtila en células HEK 293	61
6.3.	Análisis del efecto de los EACs y EEAs de frutos de distintos genotipos de murtila sobre el número de inclusiones de polyQ ₇₉ -EGFP	63
6.4.	Validación del efecto de los extractos seleccionados sobre la agregación proteica	67
7.	Análisis por CLAE-UV-ESI-EM/EM de los extractos seleccionados	71
VI.	DISCUSIÓN	84
1.	Rendimiento del proceso de extracción	84
2.	Perfil polifenólico de los extractos obtenidos a partir de frutos los distintos genotipos de murtila	86
2.1.	Análisis del contenido de fenoles totales de los extractos obtenidos a partir de frutos de distintos genotipos de murtila	86
2.2.	Análisis por CCF de los extractos obtenidos a partir de frutos de distintos genotipos de murtila	88
2.3.	Análisis por CCF de alta resolución y análisis de componentes principales de los extractos obtenidos a partir de frutos de distintos genotipos de murtila	90
2.4.	Análisis por CLAE-DAD de los extractos obtenidos a partir de distintos genotipos de murtila	93
3.	Análisis del efecto de los extractos obtenidos de frutos de distintos genotipos de murtila sobre la agregación proteica	94
4.	Identificación de compuestos polifenólicos en los extractos seleccionados	99
VII.	CONCLUSIONES	109
VIII.	REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	111

ABREVIATURAS

AAD: 7-aminoactinomicina

ABTS: 2,2'-azino-bis

ACE: Acetona

AG: Ácido gálico

A β : Péptido β amiloide

CCF: Cromatografía en capa fina

CFT: Contenido de fenoles totales

CLAE: Cromatografía líquida de alta eficiencia

DAD: Arreglo de diodos, del inglés *diode array detector*.

DCM: Diclorometano

DMEM: *Dulbecco's modified Eagle's medium*

DMSO: Dimetilsulfóxido

DPPH: Radical 2,2-difenil-1-picrilhidrazilo

DS: Desviación estándar

EA: Enfermedad de Alzheimer

EAC: Extracto obtenido con acetona

EAE: Extrato acetato de etilo

EAG: Equivalentes de ácido gálico

EAPM: Especies de alto peso molecular

EC: Extracto concentrado

ECL: Quimioluminiscencia aumentada, del inglés *Enhanced chemiluminescence*

EDCM: Extracto de diclorometano

EEA: Extracto obtenido con etanol acidificado

EET: Extracto etanólico

EGFP: Proteína verde fluorescente mejorada, del inglés *Enhanced green fluorescent protein*

EH: Enfermedad de Huntington

EHex: Extracto hexánico

ELA: Esclerosis lateral amiotrófica

EP: Enfermedad de Parkinson

EtOH-ac: Etanol acidificado

FBS: Suero fetal bovino, del inglés *fetal bovine serum*.

FDA: Administración de alimentos y fármacos

FE: Fase estacionaria

FRAP: Capacidad de reducción férrica del plasma, del inglés *Ferric reducing ability of plasma*

G: Genotipo

GFP: Proteína fluorescente verde, del inglés *Green fluorescent protein*

Gpa: Glícogeno fosforilasa a

Hoechst 33342: 2'-[4'-etoxifenil]-5-[4-metilpiperazin-1-il]-2,5'-bis-1h-benzimidazol trihidrocloruro trihidrato

HSR: Respuesta a shock térmico, del inglés *heat shock response*.

HTS: Análisis a gran escala, del inglés *High throughput screening*

HTT: Huntingtina

INIA: Instituto de investigaciones agropecuarias

mHTT: HTT mutante

EM: Espectrometría de masas

NP/PEG: Revelador *2-aminoetil-difenilborato – polietilenglicol*

NT: No tratado

ORAC: *Oxygen Radical Absorbance Capacity*

pAs: p-anisaldehído sulfúrico

PCA: Análisis de componentes principales, del inglés *principal component analysis*

PEI: Polietilenimina

PMD: Desórdenes de conformación proteica, del inglés *protein misfolding diseases*.

PolyQ: Poliglutamina

PTP1B: *Protein tyrosine phosphatase 1B*

Q: Quercetina

R: Coeficiente de correlación lineal de Pearson

R: Rutina

Rf: Factor de retardo

RP-18: Fase reversa

SNC: Sistema nervioso central

SOD1: Superóxido dismutasa 1

TEAC: *Trolox Equivalent Antioxidant Capacity*

TPA: *Tissue Plasminogen Activator*

TROLOX: Ácido-6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcroman-2-carboxílico

UPR: Respuesta a proteínas mal plegadas, del inglés *unfolded protein response*

UPS: Sistema ubiquitina-proteosoma, del inglés *ubiquitin-proteasome system*.

α Syn: Alfa sinucleína

τ: Tau

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Listado de los genotipos de frutos *Ugni molinae* recolectados para este estudio, región y localidad de la recolección original llevada a cabo por el INIA, criterio de selección y código herbario.

Tabla 2. Condiciones cromatográficas para análisis por CCF.

Tabla 3. Condiciones cromatográficas para análisis por CCF de alta resolución

Tabla 4. Gradiente de solventes para el análisis mediante CLAE-DAD.

Tabla 5. Condiciones cromatográficas para la identificación de compuestos fenólicos por CLAE-UV-ESI-EM/EM.

Tabla 6. Rendimiento obtenido para los extractos seriados de cada genotipo expresados como porcentaje (%) y código del testigo herbario del herbario SQF de la Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas de la Universidad de Chile.

Tabla 7. CFT de los EACs de los frutos de distintos genotipos de murtila

Tabla 8. CFT de los EEAs de los frutos de distintos genotipos de murtila

Tabla 9. Listado de patrones de compuestos fenólicos analizados por CLAE-DAD.

Tabla 10. Identificación tentativa de compuestos polifenólicos en los EACs por CLAE-DAD.

Tabla 11. Identificación tentativa de compuestos polifenólicos en los EEAs por CLAE-DAD.

Tabla 12. Identificación y semicuantificación relativa de compuestos fenólicos en los extractos seleccionados

Tabla 13. Identificación tentativa de los compuestos polifenólicos con una mayor concentración relativa en el EEA del genotipo 19-1.

Tabla 14. Identificación tentativa de antocianinas en los extractos seleccionados

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Estructura de los flavonoides.

Figura 2. Recolección del material vegetal.

Figura 3. Esquema del proceso de extracción seriada con solventes de polaridad creciente de los frutos de murtila.

Figura 4. Representación de la separación de 2 compuestos (A y B) por CCF.

Figura 5. Esquema del proceso automatizado de análisis por CCF de alta resolución con instrumentación CAMAG®.

Figura 6. Diseño de aplicación de las muestras en las placas de CCF de alta resolución utilizando el *Automatic TLC Sampler* (CAMAG®).

Figura 7. Esquema del procesamiento de las imágenes obtenidas a partir del análisis por CCF de alta resolución en rTLC

Figura 8. Rendimientos obtenidos por los EACs y EEAs de los diferentes genotipos analizados.

Figura 9. Curva de calibración de ácido gálico para la cuantificación del CFT por la técnica de Folin-Ciocalteu.

Figura 10. CFT de los EACs de frutos de distintos genotipos de murtila.

Figura 11. CFT de los EEAs de frutos de distintos genotipos de murtila.

Figura 12. Comparación del CFT entre los EACs y EEAs para los frutos de distintos genotipos de murtila.

Figura 13. CFT promedio de los extractos de hojas y frutos de *Ugni molinae*.

Figura 14. CCF de los EACs de frutos de distintos genotipos de murtila.

Figura 15. CCF de los EEAs de frutos de distintos genotipos de murtila.

Figura 16. CCF comparativa de los EEAs y EACs de frutos de distintos genotipos de murtila y patrones de compuestos fenólicos.

Figura 17. CCF de alta resolución de los EEAs y EACs de los frutos de distintos genotipos de murtila.

Figura 18. CCF de alta resolución de los EEAs y EACs de los frutos de distintos genotipos de murtila.

Figura 19. CCF de alta resolución de los EEAs y EACs de los frutos de distintos genotipos de murtila.

Figura 20. PCA de los datos obtenidos a partir de la placa de CCF de alta resolución desarrollada con fase móvil (1), derivatizada con p-anisaldehído sulfúrico, y observada a 366 nm.

Figura 21. PCA de los datos obtenidos a partir de la placa de CCF de alta resolución desarrollada con fase móvil (1), derivatizada con el reactivo NP, y observada a 366 nm.

Figura 22. PCA de los datos obtenidos a partir de la placa de CCF de alta resolución desarrollada con fase móvil (2), derivatizada con p-anisaldehído sulfúrico, y observada a 366 nm.

Figura 23. Cromatogramas obtenidos para la mezcla de patrones de referencia.

Figura 24. Cromatogramas obtenidos por CLAE-DAD para el EAC del genotipo 22-1.

Figura 25. Cromatogramas obtenidos por CLAE-DAD para el EEA del genotipo 14-4.

Figura 26. Identificación de Quercetina a 280 nm en el EAC del genotipo 27-1 por CLAE-DAD.

Figura 27. Identificación tentativa de ácido caféico, rutina, miricetina, quercetina y canferol a 360 nm en el extracto EAC del genotipo 27-1 por CLAE-DAD.

Figura 28. Análisis de la formación de inclusiones de polyQ₇₉-EGFP en células HEK293.

Figura 29. Análisis de la reproducibilidad del modelo de transfección transitoria para análisis de la agregación de polyQ₇₉-EGFP en la plataforma *cellomics*.

Figura 30. Análisis de la toxicidad celular de los EAC y EEA de frutos de distintos genotipos de murtila en células HEK293.

Figura 31. Relación entre la toxicidad celular y el CFT de los EACs y EEAs de frutos de distintos genotipos de murtila.

Figura 32. Efecto de los EACs sobre el número de inclusiones de polyQ₇₉-EGFP en células HEK293.

Figura 33. Efecto de los EEAs sobre el número de inclusiones de polyQ₇₉-EGFP en células HEK293.

Figura 34. Expresión del péptido de polyQ₇₉-EGFP en células HEK293 luego de 24 horas de tratamiento con los EEAs.

Figura 35. Efecto de los extractos seleccionados sobre los niveles de EAPM de polyQ₇₉-EGFP.

Figura 36. Efecto de los extractos seleccionados sobre los niveles de las EAPM de mHTT_{Q85}-GFP.

Figura 37. Efecto de los extractos seleccionados sobre los niveles de polyQ₁₁-EGFP.

Figura 38. Distribución de subtipos de compuestos polifenólicos tentativamente identificados en el análisis por CLAE-UV-ESI-EM.

Figura 39. Cromatogramas a 280 nm de los extractos seleccionados.

Figura 40. Cromatogramas UV a 520 nm obtenidos desde los análisis CLAE-UV-EM de los extractos seleccionados.

Figura 41. Estructura básica de los flavonoides.

RESUMEN

Dentro de los productos naturales más ampliamente distribuidos en el reino vegetal se encuentran los compuestos polifenólicos y más específicamente los flavonoides, de los cuales se han descrito alrededor de 10.000 compuestos hasta la fecha. Este tipo de compuestos se han estudiado principalmente debido a su capacidad antioxidante, pero diversos estudios también han demostrado que los flavonoides poseen propiedades antiinflamatorias, hipoglicemiantes, y neuroprotectoras.

Diversas enfermedades neurodegenerativas son causadas por la acumulación y agregación de proteínas mal plegadas. Estas enfermedades, denominadas *desordenes de malconformación proteica*, incluyen entre otras a la enfermedad de Alzheimer, la enfermedad de Parkinson, la esclerosis lateral amiotrófica, y la enfermedad de Huntington. En esta última, una mutación en el gen que codifica para la proteína huntingtina (HTT), provoca una extensión en el número del aminoácido glutamina (polyQ) que provoca la formación de agregados y, consecuentemente, la muerte de las neuronas. A pesar de los avances en el conocimiento de las bases moleculares de este tipo de enfermedades, hoy en día no existen tratamientos que prevengan, curen, o detengan el desarrollo de éstas. En este contexto, el análisis de extractos de plantas ricas en compuestos polifenólicos se posiciona como una estrategia prometedora para la búsqueda de terapias que prevengan o traten las enfermedades neurodegenerativas.

La murtilla (*Ugni molinae*) es un berry nativo de Chile que se caracteriza por poseer una gran concentración de polifenoles y cuyas hojas han sido utilizadas por la medicina tradicional para el tratamiento de infecciones. Nuestro grupo ha analizado los efectos neuroprotectores de un extracto de hojas de murtilla silvestre en un modelo transgénico de la enfermedad de Alzheimer, observando que la administración del extracto previene el deterioro de la memoria y reduce la velocidad de la progresión de la enfermedad. Sin embargo, el efecto que podrían tener los frutos de murtilla en el contexto de las enfermedades neurodegenerativas no ha sido estudiado.

El objetivo de este proyecto fue el de correlacionar la composición polifenólica de extractos obtenidos a partir de frutos de murtilla de 8 genotipos cultivados bajo las mismas condiciones edafoclimáticas, con sus efectos sobre la agregación proteica

anormal relacionada al desarrollo de enfermedades neurodegenerativas. Se obtuvieron los extractos de diclorometano (EDCMs), acetona (EACs), y etanol acidificado (EEAs) por maceración consecutiva de los frutos liofilizados y triturados. Los EACs y los EEAs fueron seleccionados debido a que representan una fuente rica en polifenoles. Luego, se utilizaron diversas técnicas espectrofotométricas y cromatográficas para la caracterización química de los extractos (Folin-ciocalteu, CCF, CCF de alta resolución y CLAE-DAD), dando cuenta de la influencia del genotipo sobre la composición química de los frutos de murtilla. El análisis de viabilidad celular mostro una toxicidad sobre células HEK293 de los EACs a altas concentraciones, mientras que los EEAs mostraron bajas toxicidades a las concentraciones analizadas. Los efectos sobre la agregación proteica se analizaron a través de microscopía de fluorescencia automatizada utilizando un modelo celular donde se sobreexpresó un péptido con 79 repeticiones de polyQ (polyQ₇₉) que se caracteriza por formar inclusiones intracelulares. Luego se validaron los resultados obtenidos analizando el efecto de 5 extractos seleccionados sobre los niveles de agregación de polyQ₇₉ y también de HTT mutante (mHTT_{Q85}), donde solo el EEA del genotipo 19-1 destacó por sus efectos sobre los niveles de agregación de ambos péptidos. Finalmente, el análisis por CLAE-ESI-EM/EM dio cuenta de la gran cantidad de compuestos polifenólicos presentes en los extractos seleccionados, confirmando diferencias existentes entre los genotipos. Estos resultados sugieren que las diferencias en el perfil de compuestos polifenólicos serían las responsables de las variaciones en sus efectos sobre la agregación proteica y, debido a que los frutos fueron cultivados bajo las mismas condiciones edafoclimáticas, las diferencias observadas se deben a las diferencias en el genotipo. Por lo tanto, debido a su baja citotoxicidad y efectos sobre la agregación proteica, el EEA 19-1 se posiciona como un candidato prometedor para análisis de sus efectos neuroprotectores en modelos *in vivo* de enfermedades neurodegenerativas, además de posicionarse como materia prima para el desarrollo de productos nutracéuticos.

ABSTRACT

Among natural products in the plant kingdom, polyphenolic compounds, and more specifically flavonoids, are among the most distributed. This type of compounds has been principally studied for their antioxidant properties, but several studies have demonstrated their anti-inflammatory, hypoglycemic and neuroprotective properties.

Several neurodegenerative disorders are caused by the accumulation and aggregation of misfolded proteins. Among these diseases, commonly known as protein misfolding diseases (PMDs), Alzheimer's disease, Parkinson's disease, Amyotrophic lateral sclerosis and Huntington's disease are included. In Huntington's disease, a mutation in the gene encoding huntingtin (HTT) generates a glutamine extension (polyQ) which in turn facilitates aggregate formation and, consequently, the death of neurons. Although major advances have been made in the understanding of the molecular basis of these diseases, today there are no treatments that can prevent, cure or stop their development in humans. In this context, the analysis of polyphenolic rich plant extracts represents a promising strategy for the search of new therapies that can prevent or cure neurodegenerative diseases.

Murtilla (*Ugni molinae*, Turcz.) is a native Chilean berry which is a major source of polyphenolic compounds, and whose leaves have been used by the folk medicine for the treatment of infections. Our group has analyzed the neuroprotective effects of a wild type murtilla leaves extract in a transgenic model of Alzheimer's disease, observing that the oral administration of the extract prevents the detrimental effects over cognition and memory, reducing the rate of progression of the disease. In this context, the effect of murtilla fruits over neurodegeneration has not been studied.

The aim of this study was to correlate the polyphenolic composition of extracts obtained from 8 murtilla genotypes cultivated under the same climate and soil conditions with their effects over the abnormal protein aggregation related to neurodegenerative disease development. Dichloromethane, acetone and ethanol (1% formic acid) extracts were obtained by consecutive maceration of the lyophilized and triturated fruits. Acetone extracts (EACs) and ethanol extracts (EEAs) were selected for analysis as they represent a rich source of polyphenolic compounds. Then, different spectrophotometric and

chromatographic techniques were used (Folin-Ciocalteu, TLC, HPTLC, and LC-DAD) for the chemical characterization of the extracts, with results reflecting the influence on genotype over the chemical composition of the extracts. Cell viability analysis showed that EACs were toxic for HEK293 cell at high concentrations, meanwhile EEAs showed low levels of toxicity. The effect over protein aggregation was analyzed through automated fluorescence microscopy using a human cell model overexpressing a peptide that consisted on 79 repetitions of glutamine fused to EGFP (polyQ₇₉-EGFP), which forms intracellular inclusions. 5 extracts were selected (SEs) for further validation through Western blot, analyzing the effect of their treatment over levels of polyQ₇₉-EGFP and mHTTQ₈₅-GFP aggregates. From this validation, only the treatment with EEA 19-1 had effects over the levels of both peptides. Finally, the analysis through LC-ESI-MS/MS showed a diversity of polyphenolic compounds in the SEs, confirming the differences among genotypes. These results suggest that the differences among the polyphenolic profile are responsible for the differences observed on the effects over toxicity and protein aggregation of the murtila extracts and, as the fruits were cultivated under the same soil and climate conditions, those differences are due to genotype differences in the fruits. In conclusion, due to its low cytotoxicity and effects over protein aggregation, EEA 19-1 represents a promising candidate for the analysis of its effects on in vivo models of neurodegenerative diseases, and for the development of nutraceutical products.

I. INTRODUCCIÓN

1. Productos naturales y el descubrimiento de fármacos

Los productos naturales han sido históricamente una abundante fuente de compuestos químicos para los procesos de descubrimiento de fármacos (Harvey, Edrada-Ebel, & Quinn, 2015). El auge del estudio de los productos naturales para el descubrimiento de nuevas terapias farmacológicas se vivió durante las décadas de 1970 y 1980, especialmente a partir de metabolitos secundarios presentes en plantas. Sin embargo, la progresiva aparición de nuevas técnicas de *análisis a gran escala* (HTS, del inglés *high-throughput screening*) contra blancos moleculares específicos, y el desarrollo de la *química combinatorial*, que permite la rápida síntesis de un gran número de moléculas estructuralmente relacionadas, provocaron que las compañías farmacéuticas centraran su atención en el desarrollo de librerías de compuestos sintéticos, disminuyendo a su vez la investigación de productos naturales (Koehn & Carter, 2005). Sin embargo, los esfuerzos por encontrar nuevos fármacos a partir de esas grandes librerías de compuestos sintéticos no han cumplido las expectativas e incluso, un análisis llevado a cabo por la *Administración de alimentos y fármacos* (FDA, del inglés *Food and Drug Administration*) de Estados Unidos reveló que entre 1981 y el 2010, un 34% de los fármacos químicos eran provenientes de productos naturales o eran derivados de compuestos provenientes de productos naturales (Harvey, Edrada-Ebel, & Quinn, 2015). Esto puede deberse a que las estructuras provenientes de productos naturales se caracterizan por poseer una alta diversidad química, además de presentar propiedades que las hacen semejantes a fármacos (tales como masa molecular, centros quirales, flexibilidad molecular, entre otros), y de haber sido seleccionadas a través del proceso evolutivo de los organismos que las sintetizan para interactuar con una amplia variedad de blancos moleculares y así ejercer diversas acciones (Koehn & Carter, 2005).

Por lo tanto, la búsqueda de nuevos fármacos a través de la obtención y análisis de las propiedades farmacológicas de extractos de plantas, o fracciones de estos extractos, se ha posicionado como una alternativa promisoría para el desarrollo de nuevas terapias. Esto se debe al amplio número de metabolitos secundarios que son producidos por las plantas, además de la gran diversidad estructural de aquellas moléculas sintetizadas a partir del metabolismo secundario de las especies vegetales.

Un claro ejemplo de la gran diversidad química presentes en el reino vegetal es que hasta el día de hoy se han reportado alrededor de 3.000 metabolitos presentes solo en la hoja del tabaco (Kim, Choi, & Verpoorte, 2010).

2. Compuestos polifenólicos

Dentro de los metabolitos secundarios más ampliamente distribuidos en las plantas se encuentran los compuestos polifenólicos. El consumo de alimentos ricos en este tipo de compuestos ha sido ligado a diversos efectos benéficos para la salud, principalmente debido a la gran cantidad de evidencia epidemiológica que ha relacionado la llamada “dieta mediterránea”, rica en polifenoles, con una baja en la mortalidad, además de una menor incidencia de enfermedades coronarias y ciertos tipos de cáncer (Rodrigo & Gil-Becerra, 2014; H. Zhang & Tsao, 2016). A su vez, entre los compuestos polifenólicos más ampliamente distribuidos en el reino vegetal podemos mencionar a los flavonoides. Los flavonoides corresponden a metabolitos secundarios estructuralmente diversos que derivan del núcleo benzo- γ -pirona. Estos compuestos se clasifican en: flavanoles, flavonas, flavonoles, flavanonas, dihidroflavonoles, isoflavonas, y compuestos afines tales como las antocianinas (Heim, Tagliaferro, & Bobilya, 2002) (**Figura 1**). Éstos son sintetizados en las plantas a través de la vía de los fenilpropanoides, que comienza con la transformación de fenilalanina en 4-coumaroil-CoA, que luego es transformado por la enzima chalcona-sintasa en una chalcona que por acción de una enzima isomerasa se transforman en el núcleo benzo- γ -pirona (C6-C3-C6) del que derivan todos los flavonoides. En la actualidad se han identificado alrededor de 10.000 compuestos del tipo flavonoide en hojas, semillas, raíces y flores de numerosas plantas, número que muy probablemente seguirá aumentando con el paso del tiempo (Mathesius, 2018). Estos metabolitos secundarios son los responsables de la coloración de la mayoría de las flores, frutos y semillas, y sus principales funciones son la de entregar protección contra la radiación ultravioleta, patógenos y herbívoros, y la de atraer polinizadores (Falcone Ferreyra, Rius, & Casati, 2012; Mathesius, 2018). Los flavonoides se encuentran en las plantas principalmente en la forma de glicósidos, es decir, unidos a uno o más azúcares. Estos azúcares comúnmente se unen a los hidroxilos de los carbonos C3 y/o C7 formando así O-glicósidos, siendo la D-glucosa y la L-ramnosa los azúcares más comúnmente unidos a las agliconas (Verri, Vicentini, Baracat, Georgetti, Cardoso, Cunha, Ferreira, Cunha, Fonseca, & Casagrande, 2012).

Las antocianinas, por su parte, corresponden a una clase compuestos hidrosolubles que se clasifican dentro del grupo de los flavonoides y que difieren de los demás compuestos que son parte de este grupo debido a que presentan una carga positiva formal en el oxígeno del anillo pirano (Barnes, Nguyen, Shen, & Schug, 2009). Las antocianinas son los pigmentos más importantes de las plantas vasculares y son responsables de las coloraciones anaranjadas, rosadas, rojas, violetas y azules en sus flores y frutos (Castañeda-Ovando, Pacheco-Hernández, Páez-Hernández, Rodríguez, & Galán-Vidal, 2009). El color de las antocianinas depende de 3 factores: su estructura, la acidez del medio en el que se encuentra y la presencia de copigmentos. En medios ácidos con un pH menor a 2,5 las antocianinas se encuentran en el estado de catión flavilio, donde presentan coloración roja. En soluciones donde la acidez es más débil (pH entre 4-6), las antocianinas adoptan la estructura de anhidrobases con una coloración púrpura que rápidamente se decolora al formarse la pseudobase incolora correspondiente, debido al ataque nucleofílico del agua al anillo pirano. A pH sobre 8, el anillo pirano se abre formando una chalcona que adopta una coloración amarilla (Barnes, Nguyen, Shen, & Schug, 2009).

Una fuente importante de compuestos del tipo polifenólico, y en especial de flavonoides, corresponde a los denominados *frutos del bosque*, también conocidos como *berries*. Los *berries* se caracterizan principalmente por poseer una gran cantidad de flavonoides y antocianinas (Tian, Liimatainen, Alanne, Lindstedt, Liu, Sinkkonen, Kallio, & Yang, 2017), siendo los más conocidos y demandados a nivel mundial la frutilla, el arándano, la cereza y la mora. Chile es el exportador de *berries* más importante del hemisferio sur, pero en nuestro país además se produce el maqui, el calafate y la murtila. Estos últimos, a diferencia de la frutilla, arándano, cereza y mora, corresponden a *berries* nativos de nuestro país. El maqui, el calafate, y la murtila han despertado un gran interés debido a que concentran una mayor cantidad de polifenoles, además de poseer una significativa capacidad antioxidante en comparación a otros *berries* producidos en Chile (Fuentes, Figueroa, Valdenegro, & Vinet, 2019; Lecaros, Lecaros, Gloger, Scheuermann, & Samarotto, 2014; López, Vega-Gálvez, Rodríguez, Uribe, & Bilbao-Sainz, 2018)

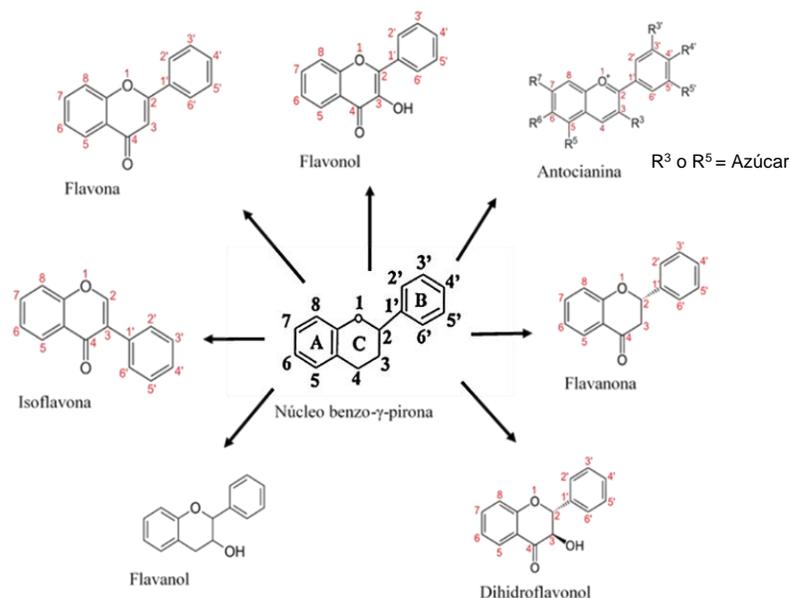


Figura 1. Estructura de los flavonoides. Estructura del núcleo benzo- γ -pirona y de los flavonoides derivados de este: flavonoles, flavanonas, dihidroflavonoles, flavanoles, isoflavonas, flavonas y antocianinas.

3. La murtila

La murtila, también conocida como murta, de nombre científico *Ugni molinae*, Turcz., es un arbusto silvestre siempreverde que pertenece a la familia Myrtaceae, el cual se distribuye en la zona centro - sur de Chile (Brito, Areche, Sepulveda, Kennelly, & Simirgiotis, 2014). Este arbusto se encuentra específicamente en la cordillera de la costa y los faldeos cordilleranos ubicados entre la VII y la X Región de nuestro país (Junqueira-Goncalves, Yanez, Morales, Navarro, R, & Zuniga, 2015; López, Vega-Gálvez, Rodríguez, Uribe, & Bilbao-Sainz, 2018). Los frutos de esta especie (bayas) poseen una forma globosa, con un diámetro ecuatorial de 0,71 a 1,31 cm, caracterizándose por su agradable sabor y aroma (Aguirre, Delporte, Backhouse, Erazo, Letelier, Cassels, Silva, Alegria, & Negrete, 2006), razón por la cual tradicionalmente han sido utilizados con fines alimentarios, ya sea para la fabricación de mermeladas, té, postres y licores, o simplemente para su consumo directo (Alfaro, Mutis, Palma, Quiroz, Seguel, & Scheuermann, 2013). En el año 1996 el Instituto Investigaciones Agropecuarias (INIA) recolecto 100 accesiones de murtila en un área comprendida entre la VII y X Región de nuestro país. Esta recolección fue parte de un proyecto FONDECYT cuyo propósito era

el de obtener material vegetal que, a través de un proceso de domesticación, pudiera transformarse en un nuevo cultivo con potencial de comercialización a nivel nacional y de exportación (Seguel, Peñaloza, Gaete, Montenegro, & Torres, 2000). Como parte de este proyecto, se contempló la caracterización molecular de las accesiones recolectadas a través de la técnica de ADN polimórfico amplificado al azar (RAPD, del inglés *Random Amplification of Polymorphic DNA*). A partir de este análisis se pudo dar cuenta de la gran variabilidad genética dentro de una muestra representativa de las accesiones recolectadas de *U. molinae*, característica que sugiere la posibilidad de mejorar los atributos comerciales de esta especie endémica (Seguel, Peñaloza, Gaete, Montenegro, & Torres, 2000). Como producto de este proyecto de domesticación se obtuvieron 2 variedades comerciales que actualmente están inscritas en el Registro de Variedades Protegidas de Chile, patentadas en Estados Unidos, y protegidas en el Instituto Nacional de Semillas (INASE) de Argentina. Estas variedades corresponden a la *Red Pearl INIA* y la *South Pearl INIA* (Seguel, Torralbo, & Shenemann, 2017). Ambas variedades fueron parte de este estudio.

3.1 Composición química y propiedades farmacológicas de la murtila

Diversos estudios han analizado la composición química de las hojas de murtila, observando que éstas presentan una gran cantidad de compuestos polifenólicos, además de ácidos triterpénicos pentacíclicos (López, Vega-Gálvez, Rodríguez, Uribe, & Bilbao-Sainz, 2018). Dentro de los compuestos polifenólicos identificados en extractos de hojas de murtila se pueden mencionar, principalmente, diversos derivados glicosilados de flavonoles tales como quercetina, miricetina y canferol, además de ácidos fenólicos como el ácido gálico. (López, Vega-Gálvez, Rodríguez, Uribe, & Bilbao-Sainz, 2018; Peña-Cerda, Arancibia-Radich, Valenzuela-Bustamante, Pérez-Arancibia, Barriga, Seguel, Garcia, & Delporte, 2017; Rubilar, Jara, Poo, Acevedo, Gutierrez, Sineiro, & Shene, 2011; Rubilar, Pinelo, Ihl, Scheuermann, Sineiro, & Nuñez, 2006) Por otro lado, ácidos triterpénicos tales como el ácido asiático, ursólico, madecásico y maslínico han sido identificados en extractos de dichas hojas (Aguirre, Delporte, Backhouse, Erazo, Letelier, Cassels, Silva, Alegria, & Negrete, 2006; Arancibia-Radich, Peña-Cerda, Jara, Valenzuela-Bustamante, Goity, Valenzuela-Barra, Silva, Garrido, Delporte, & Seguel, 2016; Goity, 2013; Goity, Queupil, Jara-Moreno, Alegría, Peña-Cerda, Barriga, Aguirre, & Delporte, 2013; Queupil Carrasco, 2011). La presencia de

compuestos polifenólicos y triterpénicos en las hojas de *Ugni molinae* ha despertado el interés por el estudio de la bioactividad que pudieran presentar los extractos obtenidos a partir de éstas. Por ejemplo, en el Laboratorio de Productos Naturales de la Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas de la Universidad de Chile, se han estudiado las propiedades inhibitorias de extractos obtenidos desde hojas de murtil silvestre recolectadas en la zona de Cauquenes (Región del Maule) sobre la enzima glicógeno fosforilasa a (GPa) (Peña-Cerda, 2011; Queupil Carrasco, 2011). También se ha estudiado su actividad antiinflamatoria tópica en un modelo de edema en oreja de ratón inducido por acetato de tetradecanoilforbol (TPA) (Aguirre, Delporte, Backhouse, Erazo, Letelier, Cassels, Silva, Alegria, & Negrete, 2006; Goity, Queupil, Jara-Moreno, Alegría, Peña-Cerda, Barriga, Aguirre, & Delporte, 2013).

Por otro lado, se han obtenido extractos seriados de hojas de 10 genotipos (Gs) de murtil cultivados en las mismas condiciones edafoclimáticas por el INIA, en Carillanca, utilizando solventes de polaridad creciente (Arancibia-Radich, Peña-Cerda, Jara, Valenzuela-Bustamante, Goity, Valenzuela-Barra, Silva, Garrido, Delporte, & Seguel, 2016; Peña-Cerda, Arancibia-Radich, Valenzuela-Bustamante, Pérez-Arancibia, Barriga, Seguel, Garcia, & Delporte, 2017). A partir de las hojas de estos Gs de murtil se han obtenido los extractos hexánicos (EH), extractos de diclorometano (EDCM), de acetato de etilo (EAE) y etanólicos (EET). De éstos, especialmente en aquellos donde se concentran triterpenos (EAEs) y flavonoides (EETs), se han realizado estudios para determinar su actividad antioxidante a través de metodologías *in vitro*, tales como el ensayo de capacidad de reducción férrica del plasma (FRAP, de sus siglas en inglés Ferric Reducing Ability of Plasma) y DPPH (Peña-Cerda, Arancibia-Radich, Valenzuela-Bustamante, Pérez-Arancibia, Barriga, Seguel, Garcia, & Delporte, 2017; Pérez-Arancibia, 2015; Valenzuela-Bustamante, 2015). Con estos extractos además se ha medido su capacidad inhibitoria de enzimas relacionadas al control de la glicemia, tales como la GPa, la proteína tirosina fosforilasa 1B (PTP1B) (Bugueño, 2015) y la α -glucosidasa (Veas, 2016). También, se han estudiado las propiedades antiinflamatorias del EET del genotipo 22-1 (G 22-1) y del EAE del genotipo 23-2 (G 23-2) utilizando un modelo celular de fibroblastos cardíacos (Figuroa, 2015). Posteriormente, un estudio determinó la composición de compuestos fenólicos y triterpénicos de los EAE y los EET, además de medir la actividad antiinflamatoria vía oral de dichos extractos, encontrando diferencias significativas que podrían relacionarse a las diferencias entre las hojas

provenientes de los diez Gs estudiados de murtila (Arancibia-Radich, Peña-Cerda, Jara, Valenzuela-Bustamante, Goity, Valenzuela-Barra, Silva, Garrido, Delporte, & Seguel, 2016). Además, se ha determinado que uno de los EAE estudiados y el ácido madecásico, uno de los compuestos presentes en el extracto, poseen efectos positivos sobre la resistencia a la insulina y la disfunción endotelial en un modelo de ratones obesos (Arancibia-Radich, Gonzalez-Blazquez, Alcalá, Martín-Ramos, Viana, Arribas, Delporte, Fernández-Alfonso, Somoza, & Gil-Ortega, 2019).

A diferencia de las hojas, los frutos de esta especie nativa han sido menos estudiados respecto de su composición química y potencial actividad farmacológica, ya que solo se ha descrito la presencia de compuestos polifenólicos en estos frutos y se ha analizado su potencial como antioxidante a través de estudios *in vitro*, tales como DPPH, FRAP, capacidad antioxidante equivalente al TROLOX (TEAC), capacidad antioxidante frente a radicales de oxígeno (ORAC) y el ensayo del radical ácido 2,2'-azino-bis(3-etilbenzotiazolin-6-sulfónico) (ABTS) (Augusto, Salinas, Alencar, D'Arce, Camargo, & Vieira, 2014; Brito, Areche, Sepulveda, Kennelly, & Simirgiotis, 2014; Junqueira-Goncalves, Yanez, Morales, Navarro, R, & Zuniga, 2015; Ramirez, Zambrano, Sepulveda, Kennelly, & Simirgiotis, 2015; Rodríguez, Ah-Hen, Vega-Gálvez, Vásquez, Quispe-Fuentes, Rojas, & Lemus-Mondaca, 2016; Ruiz, Hermosin-Gutierrez, Mardones, Vergara, Herlitz, Vega, Dorau, Winterhalter, & von Baer, 2010).

En este proyecto nos enfocaremos en el estudio de las propiedades farmacológicas de los frutos de murtila, más específicamente en los efectos que los extractos obtenidos a partir de estos frutos pudieran tener sobre la agregación proteica anormal relacionada al desarrollo de enfermedades neurodegenerativas.

4. Alteraciones de la homeostasis proteica y su implicancia en la función del cerebro

El mantenimiento de la homeostasis proteica, o proteostasis, es indispensable tanto para la supervivencia de la célula como para el correcto funcionamiento de nuestro organismo (Hipp, Park, & Hartl, 2014). El mantenimiento de la estabilidad del proteoma está modulado por una red de diversas vías de señalización inducibles compuesta por la vía de respuesta a shock térmico (HSR, del inglés *Heat Shock Response*), la vía de

respuesta a proteínas mal-plegadas (UPR, del inglés *unfolded protein response*), respuestas antioxidantes, el sistema ubiquitina-proteosoma (UPS, del inglés *ubiquitin-proteasome system*), la UPR mitocondrial y la macro autofagia (Balch, Morimoto, Dillin, & Kelly, 2008; Mardones, Martinez, & Hetz, 2015). Pero el mantenimiento de la proteostasis requiere de una precisa y constante coordinación de esta red, ya que las proteínas son poco estables a temperatura fisiológica y son propensas a mal-plegarse (Hipp et al., 2014). Además, diversos factores tales como mutaciones, estresores externos y el envejecimiento, pueden reducir la efectividad de la red proteostática, aumentando la probabilidad de acumulación de proteínas mal-plegadas.

Estas proteínas mal-plegadas asumen una conformación tridimensional alternativa que es inestable en el medio acuoso debido a la exposición de residuos hidrofóbicos, y en la mayoría de los casos este proceso resulta en la formación y acumulación de agregados proteicos que son tóxicos para las células (Soto, 2003). Desde el punto de vista morfológico, se puede distinguir entre 2 tipos de agregados proteicos: los agregados amorfos, que consisten principalmente en cadenas polipeptídicas desordenadas, y las fibrillas amiloides, que consisten en estructuras repetitivas y altamente ordenadas donde los polipéptidos adoptan un plegado común rico en hojas β (Invernizzi, Papaleo, Sabate, & Ventura, 2012). La agregación proteica es un fenómeno complejo de múltiples pasos en el que diversos intermediarios podrían formarse, pero en general el proceso por el cual un péptido o proteína soluble pasa a formar un agregado se puede dividir en 3 etapas: i) la etapa de latencia, donde monómeros mal plegados, que usualmente poseen residuos aminoacídicos hidrofóbicos expuestos, se unen para formar un núcleo desde el que crecerán las fibrillas o agregados de mayor tamaño; ii) la elongación, donde la fibrilla crece debido a la rápida unión de monómeros al núcleo; y la etapa iii) de equilibrio o saturación, donde el crecimiento de las fibrillas culmina debido al agotamiento de monómeros y comienza la maduración de éstas (Chiti & Dobson, 2017; Invernizzi, Papaleo, Sabate, & Ventura, 2012).

A pesar de que se considera que las fibrillas maduras son estructuras rígidas, usualmente pueden experimentar procesos de fragmentación, acelerando el proceso de formación de nuevas fibrillas al generar nuevos núcleos de agregación. En este contexto, se ha señalado que la acumulación de estos agregados proteicos y de los intermediarios oligoméricos generados durante el proceso de agregación corresponden a la causa

subyacente de diversas enfermedades metabólicas, cancerígenas, cardiovasculares y neurodegenerativas, ya que estas especies son capaces de provocar la muerte selectiva de ciertos tipos de células (Invernizzi, Papaleo, Sabate, & Ventura, 2012). Por otro lado, la formación y acumulación de fibrillas maduras ha sido señalada como un factor protector frente a la toxicidad de los oligómeros proteicos formados durante la etapa de elongación, al funcionar como una especie de reservorio que previene las alteraciones de la homeostasis celular provocada por las especies oligoméricas (Arrasate, Mitra, Schweitzer, Segal, & Finkbeiner, 2004; Carija, Navarro, de Groot, & Ventura, 2017; Ross & Poirier, 2005). Otro proceso importante que podría estar implicado en la patogénesis y desarrollo de enfermedades asociadas a la agregación proteica, es la transmisión célula-célula de los agregados. Esta transmisión podría producirse de manera directa a través del contacto célula-célula, o por secreción o daño de la célula huésped con la consiguiente internalización de los agregados por las células vecinas. Los agregados internalizados funcionarían como núcleos para la agregación de proteínas que se han plegado normalmente, acelerando así la progresión de la enfermedad (Soto, 2012).

Como se ha sido mencionado anteriormente, en este proyecto de investigación nos centramos en las enfermedades neurodegenerativas, cuya causa común es la acumulación de agregados proteicos. Debido a esta causa común, se les denomina *desórdenes de malconformación proteica* (PMD, del inglés *Protein Misfolding Disorders*) e incluyen, entre otras, a la enfermedad de Alzheimer (EA), enfermedad de Parkinson (EP), la esclerosis lateral amiotrófica (ELA) y la enfermedad de Huntington (EH).

En el caso de la EA, tanto el péptido β amiloide ($A\beta$) como la proteína tau (τ) están implicados en la formación de oligómeros $A\beta$ solubles y placas amiloides insolubles que se depositan en el medio extracelular, y en la formación de ovillos neurofibrilares citoplasmáticos, respectivamente (Invernizzi et al., 2012). La acumulación de estas proteínas es tóxica para las neuronas del hipocampo, las cuales disminuyen progresivamente con el avance de la enfermedad, provocando la pérdida progresiva de la memoria y otras discapacidades cognitivas (Ittner & Gotz, 2011; Querfurth & LaFerla, 2010).

Por otro lado, la agregación citoplasmática de la proteína α -sinucleína (α -syn) está fuertemente implicada en la patogénesis de la EP (Bourdenx, Koulakiotis, Sanoudou, Bezard, Dehay, & Tsarbopoulos, 2017), debido a la formación de los *cuerpos de Lewy*

que provocan la pérdida de neuronas dopaminérgicas en la *sustancia negra pars compacta* del cerebro, causando pérdida de función motora en los pacientes (Strathearn, Yousef, Grace, Roy, Tambe, Ferruzzi, Wu, Simon, Lila, & Rochet, 2014).

En la ELA, la presencia de una variante mutada de la enzima superóxido dismutasa 1 (SOD1) provoca que esta proteína pierda estabilidad y, en consecuencia, sea más propensa a formar agregados tóxicos. Éstos son capaces de provocar la muerte selectiva de neuronas motoras, tanto en el cerebro como en la médula espinal, generando así una parálisis progresiva de los músculos voluntarios y, finalmente, la muerte (Pasinelli & Brown, 2006).

La EH es una enfermedad autosómica dominante causada por la expansión del triplete CAG en el gen que codifica la proteína huntingtina (HTT). Otras 9 enfermedades han sido asociadas a la extensión del triplete CAG, como las ataxias espinocerebelares y la atrofia muscular espinobulbar y en conjunto se les ha denominado enfermedades de poliglutamina o poliglutaminopatías. Esto es debido a que esta mutación conlleva a una expansión de una secuencia de poliglutaminas (polyQ) que al alcanzar un número crítico promueve el inicio y desarrollo de la enfermedad (Adegbuyiro, Sedighi, Pilkington, Groover, & Legleiter, 2017). Específicamente en la EH, un número de 40 o más repeticiones del triplete CAG está asociado a una penetrancia de casi el 100% de la enfermedad hacia los 65 años y un mayor número de repeticiones provocan un desarrollo más temprano de la enfermedad (Ross & Tabrizi, 2011). La HTT mutante (mHTT) es escindida por proteasas, generando fragmentos N-terminales que contienen la expansión de polyQ. Estos fragmentos son capaces de formar agregados del tipo amiloide que han sido descritos como tóxicos para las neuronas espinosas medianas del cuerpo estriado del cerebro, provocando la aparición de un desorden del movimiento conocido como *corea*, en el que los pacientes exhiben movimientos espásticos involuntarios (Bailus & Ellerby, 2016).

En este contexto, evidencia obtenida del estudio de ratones *knock-out* ha demostrado el rol protector de la autofagia frente a la acumulación y agregación de proteínas mal plegadas (Menzies, Fleming, Caricasole, Bento, Andrews, Ashkenazi, Fullgrabe, Jackson, Jimenez Sanchez, Karabiyik, Licitra, Lopez Ramirez, Pavel, Puri, Renna, Ricketts, Schlotawa, Vicinanza, Won, Zhu, Skidmore, & Rubinsztein, 2017), por lo que su modulación representa una potencial estrategia terapéutica para el tratamiento de

desórdenes de conformación proteica. La autofagia corresponde a un proceso de degradación lisosomal que es esencial para la supervivencia, diferenciación, desarrollo y el mantenimiento de la homeostasis celular (Levine & Kroemer, 2008), proceso que se puede ver perturbado por la presencia de agregados proteicos. La autofagia consiste, básicamente, en 3 eventos principales, 1) la formación del autofagosoma con el material citoplasmático a degradar en su interior, 2) su maduración, 3) y la fusión con el lisosoma para la degradación del contenido del autofagosoma por proteasas (Levine & Kroemer, 2008). En el caso específico de la EH, la acumulación y agregación de la mHTT impide el reconocimiento del material a ser degradado por parte de los autofagosomas y la consecuente acumulación de la proteína mutante y otras proteínas a nivel intracelular (Martinez-Vicente, Tallozy, Wong, Tang, Koga, Kaushik, de Vries, Arias, Harris, Sulzer, & Cuervo, 2010). Como se ha mencionado anteriormente, diversos compuestos polifenólicos han demostrado intervenir directamente en el proceso de agregación de proteínas al intercalarse en la estructura de los agregados en formación a través de la formación de enlaces puentes de hidrógeno con residuos aminoacídicos específicos (Ono et al., 2003; Ono et al., 2012; Takahashi et al., 2015; Das & Smid, 2014), además de modular la autofagia aumentando la eliminación de proteínas mal plegadas (Ueda et al., 2017, Nabavi et al., 2018). Así los compuestos polifenólicos provenientes de plantas se posicionan como una potencial estrategia para el tratamiento de los PMDs.

5. Polifenoles y sus efectos neuroprotectores

Hoy en día numerosos estudios señalan que existe una relación directa entre el consumo de alimentos ricos en compuestos polifenólicos, como la murtila, y mejoras en la capacidad cognitiva tanto en estudios con humanos (Macready, Kennedy, Ellis, Williams, Spencer, & Butler, 2009), como en modelos animales (Rendeiro, Rhodes, & Spencer, 2015; R. J. Williams & Spencer, 2012). Además, datos experimentales y epidemiológicos recientes sugieren que los jugos de frutas y vegetales ricos en diversos compuestos fenólicos pueden reducir el riesgo de padecer la enfermedad de Alzheimer (Vepsäläinen, Koivisto, Pekkarinen, Mäkinen, Dobson, McDougall, Stewart, Haapasalo, Karjalainen, Tanila, & Hiltunen, 2013). Un ejemplo de esto es el estudio llevado a cabo por Krikorian y colaboradores, donde por primera vez se analizaron los potenciales beneficios de la suplementación con arándanos sobre la función cognitiva de adultos mayores con riesgo

de padecer demencia (Krikorian, Shidler, Nash, Kalt, Vinqvist-Tymchuk, Shukitt-Hale, & Joseph, 2010). El estudio consistió en la suplementación a mediano plazo de jugo de arándano silvestre a adultos mayores, demostrando que la intervención por 12 semanas mejoró la memoria de sujetos adultos con disminución temprana de la memoria (Krikorian et al., 2010).

También se ha evidenciado que los polifenoles promueven el mantenimiento de la homeostasis celular del sistema nervioso central (SNC), y dicha actividad no solo estaría relacionada a su reconocida capacidad para neutralizar los radicales libres tóxicos a través de la donación de un electrón o un átomo de hidrógeno (Zhang & Tsao, 2016), sino que también poseerían la capacidad de: i) modular diversos aspectos de la función cerebral mediante la interacción con diversas vías de señalización intracelulares a nivel de la glía y de las neuronas (C. M. Williams, El Mohsen, Vauzour, Rendeiro, Butler, Ellis, Whiteman, & Spencer, 2008), ii) influir sobre el sistema cerebrovascular (Williams & Spencer, 2012), iii) reducir la neuroinflamación (Vauzour, Martinsen, & Laye, 2015), iv) proteger la mitocondria (Camilleri, Zarb, Caruana, Ostermeier, Ghio, Hogen, Schmidt, Giese, & Vassallo, 2013), e v) inhibir la formación de agregados proteicos tóxicos o modular su degradación a través de la activación de la autofagia o del sistema ubiquitina – proteasoma (Ciechanover & Kwon, 2015; Das, Stark, Musgrave, Pukala, & Smid, 2016; Nabavi, Sureda, Dehpour, Shirooie, Silva, Devi, Ahmed, Ishaq, Hashim, Sobarzo-Sanchez, Daglia, Braidy, Volpicella, Vacca, & Nabavi, 2018; Ono, Li, Takamura, Yoshiike, Zhu, Han, Mao, Ikeda, Takasaki, Nishijo, Takashima, Teplow, Zagorski, & Yamada, 2012; Ono & Yamada, 2006; Ono, Yoshiike, Takashima, Hasegawa, Naiki, & Yamada, 2003; Takahashi, Ono, Takamura, Mizuguchi, Ikeda, Nishijo, & Yamada, 2015; Ueda, Inden, Shirai, Sekine, Masaki, Kurita, Ichihara, Inuzuka, & Hozumi, 2017).

Es por lo mencionado anteriormente que los compuestos polifenólicos parecen ser interesantes candidatos para la prevención y tratamiento de diversas enfermedades neurodegenerativas. Sin embargo, y a pesar de los numerosos avances que se han hecho en el entendimiento de la patogénesis de estas enfermedades, actualmente ninguna puede ser efectivamente tratada o curada. Por lo tanto, el desarrollo de terapias que logren prevenir, curar o detener el avance de las PMDs sigue siendo uno de los grandes desafíos de la neurociencia. En este contexto, la búsqueda de fármacos provenientes de fuentes naturales ricas en compuestos polifenólicos, como los frutos de

la murtila, se posiciona como una prometedora estrategia que permitiría el descubrimiento de extractos, fracciones, o moléculas con propiedades neuroprotectoras. Esta oportunidad ha sido previamente explorada por nuestro laboratorio, donde hemos demostrado que un extracto rico en compuestos polifenólicos provenientes de las hojas de murtila silvestre inhibe la agregación y desagrega agregados preformados del péptido A β *in vitro*. Además, el tratamiento con dicho extracto revierte la toxicidad provocada por el péptido A β en un cultivo primario de neuronas hipocampales (Jara-Moreno, Riveros, Barriga, Kogan, & Delporte, 2020), previene el deterioro de la memoria, y reduce la velocidad de la progresión de la enfermedad en un modelo transgénico de la EA (Jara-Moreno, Castro-Torres, Ettcheto, Auladell, Kogan, Folch, Verdaguer, Cano, Busquets, Delporte, & Camins, 2018).

En resumen, se ha discutido el importante papel que juegan los productos naturales en el proceso de descubrimiento de nuevos fármacos a pesar de los grandes avances tecnológicos de las últimas décadas. También se han mencionado las características químicas y propiedades farmacológicas de los compuestos polifenólicos, metabolitos secundarios ampliamente distribuidos en el reino vegetal. En ese contexto, se han discutido las propiedades farmacológicas del fruto de *U. molinae*, especie chilena, cuyas bayas y hojas se caracterizan por presentar un alto contenido de compuestos polifenólicos. Finalmente, se han presentado las PMDs, que corresponden a enfermedades neurodegenerativas provocadas por la acumulación y agregación de proteínas mal plegadas, que hoy en día no pueden ser efectivamente tratadas o curadas, y por lo tanto el estudio de los frutos de murtila representa una oportunidad para el descubrimiento de extractos, fracciones, o moléculas con propiedades neuroprotectoras.

Tomando en cuenta los antecedentes presentados anteriormente, se abre la interrogante sobre el efecto que pudieran tener los compuestos fenólicos presentes en los frutos de murtila sobre la disminución en el número de agregados proteicos, y de cómo el genotipo de la especie en estudio puede influir tanto en la composición de compuestos fenólicos de los frutos, como en sus efectos biológicos. Por esta razón, se plantea la siguiente hipótesis:

II. HIPÓTESIS

Los extractos obtenidos de los frutos de distintos genotipos de *Ugni molinae* presentan variaciones en su composición fenólica, lo que se correlaciona con efectos diferenciales sobre la agregación proteica anormal.

III. OBJETIVOS

1. Objetivo general

Correlacionar la composición fenólica de cada genotipo de *Ugni molinae* con su efecto sobre la agregación proteica en un modelo celular de agregación de poliglutaminas.

2. Objetivos específicos

- a) Implementar un proceso de extracción a partir de los frutos de distintos genotipos de *Ugni molinae* para la obtención de extractos enriquecidos en compuestos polifenólicos.
- b) Caracterizar los extractos obtenidos a partir de los frutos de *Ugni molinae* de acuerdo con su composición de compuestos polifenólicos.
- c) Determinar el o los extractos obtenidos desde los frutos de murtila que tengan el mayor efecto de disminuir la agregación proteica en un modelo celular de agregación de poliglutaminas.
- d) Determinar los compuestos fenólicos presentes en aquellos extractos obtenidos desde los frutos de murtila que tengan el mayor efecto en la disminución de la agregación proteica en un modelo celular de agregación poliglutamina.

IV. MATERIALES Y MÉTODOS

1. Materiales

1.1 Reactivos

Para la realización de esta tesis se utilizaron reactivos grado CLAE como: metanol (MeOH), acetonitrilo y ácido fórmico, adquiridos en Merck (Damstadt, Alemania), y agua milli-Q preparada por un sistema Milipore Mili-Q Plus (Milipore, Bedford, MA, USA); solventes tales como hexano (HEX), acetona, etanol y ácido fórmico de grado de laboratorio para las extracciones, y solventes p.a. como metanol, acetato de etilo, ácido acético, tolueno y el reactivo de Folin-Ciocalteu (Merck) para la realización del análisis de contenido de fenoles totales (CFT); cromatofolios de fase reversa C18 con soporte de aluminio para la realización de cromatografía en capa fina y cromatofolios de fase normal en soporte de vidrio para CCF de alta resolución (CCFAR) fueron adquiridos en Merck; los reactivos 2-aminoetil-difenilborato (NP) y p-anisaldehído sulfúrico (Sigma) fueron adquiridos para el revelado de CCF y CCFAR. Compuestos de referencia como quercetina, rutina, ácido gálico, fueron adquiridos en Sigma-Aldrich (Oakville, ON, USA).

Las células HEK293 fueron obtenidas de la ATCC y mantenidas en medio de cultivo *Dulbecco's modified Eagle's médium* (DMEM) (GIBCO) con un 5% de suero fetal bovino (GIBCO) y penicilina/estreptomina al 1% (GIBCO). Para la transfección de las células con los distintos plasmidios se utilizaron el reactivo polietilenimina (PEI) y el reactivo TransIt® (Mirus Bio). Para los experimentos analizados por microscopia de fluorescencia en la plataforma *cellomics* se utilizaron las tinciones 7AAD (Thermo Fisher) y Hoescht 33342 (Abcam). El DNA fue purificado con los kits Qiagen. Se purificaron los siguientes plasmidios: PolyQ₇₉-EGFP, mHttQ₈₅-EGFP.

Para los análisis por *western blot*, se utilizó Triton X-100 en PBS con inhibidores de proteasas y fosfatasas (Roche), el kit BCA para cuantificación de proteínas (Thermo Scientific), leche descremada al 5% para el bloqueo de membranas de PVDF (Thermo Scientific), Acrilamida (Bio-Rad), buffer de corrida Tris/Glycine/SDS 10X (Bio-Rad), buffer de transferencia Trans-Blot® Turbo 5X (Bio-Rad).

Los siguientes anticuerpos y diluciones fueron utilizados: anti-GFP 1:1.000 (Santa Cruz, Cat. n° SC-9996), anti-HSP90 1:1.000 (Santa Cruz, Cat. n° SC-13119), anti-Mouse conjugado a HRP 1:10.000 (Jackson).

1.2 Material vegetal

El material vegetal investigado en este estudio corresponde a los frutos maduros de 8 genotipos de *Ugni molinae*, Turcz. (n.v. murtila) provenientes del banco de germoplasma del INIA Carillanca, los cuales fueron cultivados bajo las mismas condiciones edafoclimáticas en el sector de Tranapunte, en la IX Región de nuestro país.



Figura 2. Recolección del material vegetal. Los frutos maduros de murtila fueron manualmente recolectados durante el mes de abril del 2016 en la estación experimental del INIA, Carillanca. **A)** Frutos de murtila cultivados en INIA, Carillanca, IX Región, Chile. **B)** Cultivos de distintos Gs de murtila en el INIA, Carillanca, Temuco, IX Región, Chile.

2. Metodología

2.1 Recolección del material vegetal

Los frutos maduros de murtila fueron recolectados en el mes de abril del año 2016. Se recolectó entre 1 y 1,5 kg de los frutos de los distintos genotipos. Una vez recolectados, los frutos se limpiaron y conservaron a -20°C. Luego estos frutos fueron liofilizados por *SouthAm freeze dry* en la localidad de Buin. Los frutos liofilizados fueron triturados y almacenados en un lugar fresco, seco y protegidos de la luz hasta su posterior utilización. La selección de los genotipos se llevó a cabo de acuerdo a la calidad de sus frutos y a la cantidad de hojas producidas por los arbustos. Cabe destacar que dentro de los genotipos seleccionados para este estudio se encuentran las 2 variedades inscritas por el INIA: South Pearl y Red Pearl, que corresponden a los genotipos 19-1 y 27-1, respectivamente. Testigos herbarios de las muestras recolectadas fueron almacenados en el herbario de la Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas de la Universidad de Chile (**Tabla 1**). Imágenes de los correspondientes testigos herbarios se pueden encontrar en el **Anexo 1**.

GENOTIPO	Región	Localidad	SELECCIÓN	Código Herbario
14-4	La Araucanía	Puren	Cantidad de hojas	SQF 22549
19-1	La Araucanía	Porma	Cantidad de hojas	SQF 22554
19-1ha	La Araucanía	Porma	Cantidad de hojas	SQF 22553
19-2	Los Ríos	Mehuín	Calidad de frutos	SQF 22552
22-1	La Araucanía	Queule	Calidad de frutos	SQF 22556
23-2	Los Lagos	Aucar	Calidad de frutos	SQF 22555
27-1	Los Lagos	Lenca	Calidad de frutos	SQF 22551
31-1	La Araucanía	Porma	Calidad de frutos	SQF 22557

Tabla 1. Listado de los genotipos de frutos *Ugni molinae* recolectados para este estudio, región y localidad de la recolección original llevada a cabo por el INIA, criterio de selección y código herbario.

2.2 Obtención de los extractos secos y libres de solvente de frutos de diferentes genotipos de murtila

La preparación de los extractos se realizó a través de la técnica de maceración simple a temperatura ambiente con solventes de polaridad creciente hasta el completo agotamiento del material vegetal. Los frutos liofilizados y triturados fueron sometidos a una extracción seriada con diclorometano, acetona y etanol acidificado con 1% de ácido acético, para así obtener los extractos de diclorometano (EDCM), acetona (EAC) y etanol acidificado (EEA), respectivamente (**Figura 3**). La maceración con los distintos solventes se llevó a cabo hasta el total agotamiento del material vegetal, en una proporción sólido:solvente = 1:5 (50 g fruto liofilizado y triturado + 250 mL de solvente). El macerado obtenido de cada proceso de extracción fue filtrado al vacío utilizando papel Whatman n°1 para posteriormente ser concentrado a presión reducida utilizando un evaporador rotatorio. Los extractos concentrados fueron almacenados a 4°C protegidos de la luz. Posteriormente, estos extractos concentrados fueron dispuestos en placas de Petri previamente pesadas para luego ser secados en una estufa al vacío a temperaturas menores a los 70°C. Una vez que los extractos concentrados estuvieron secos, se pesaron las placas para determinar el peso de los extractos secos y calcular el rendimiento del proceso de extracción de acuerdo con la siguiente fórmula:

$$\% \text{ Rendimiento: } \frac{(\text{Peso placa ES} - \text{Peso placa vacía})}{\text{Peso inicial del material vegetal}} \times 100$$

Fórmula 1. Cálculo del rendimiento de los extractos. ES = extracto seco.

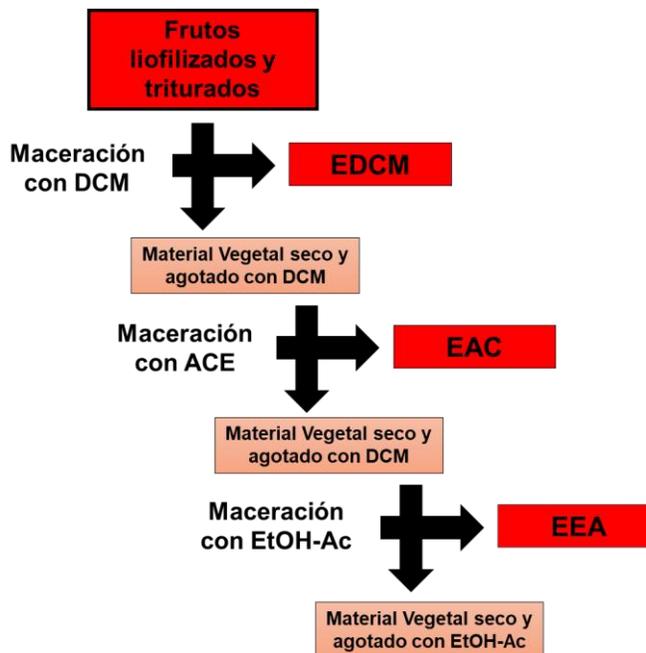


Figura 3. Esquema del proceso de extracción seriada con solventes de polaridad creciente de los frutos de murtila. La extracción se llevó a cabo a través de la maceración a temperatura ambiente del material vegetal liofilizado y triturado. Donde: DCM: Diclorometano; ACE: Acetona; EtOH-Ac: Etanol acidificado; EDCM: Extracto diclorometano; EAC: Extracto de acetona; EEA: Extracto de etanol acidificado.

2.3 Evaluación comparativa del contenido de fenoles totales

La cuantificación del contenido de fenoles totales (CFT) de los extractos ricos en compuestos fenólicos, como los EACs y EEAs, se llevó a cabo a través de la técnica de Folin-Ciocalteu. Esta técnica es ampliamente utilizada en el estudio de productos naturales y se basa en la capacidad de los compuestos polifenólicos de reducir un complejo de fosfotungstato - fosfomolibdato (Reactivo de Folin-Ciocalteu), dando forma a un complejo coloreado que puede ser cuantificado por medio de un espectrofotómetro a una longitud de onda de 765 nm (Cicco, Lanorte, Paraggio, Viggiano, & Lattanzio, 2009). Para llevar a cabo la cuantificación del CFT, se construyó una curva de calibración con ácido gálico en un rango de concentraciones entre 2 a 10 $\mu\text{g/mL}$ para así poder expresar los resultados como mg equivalentes de ácido gálico por gramo de extracto seco (mg EAG/g ES). Para el análisis se realizaron 3 experimentos independientes, a una concentración final de los extractos en la microplaca de 200 $\mu\text{g/mL}$. Las muestras fueron disueltas en MeOH a la concentración señalada y luego fueron dispuestas en una placa de 96 pocillos. Se agregaron 30 μL del reactivo de Folin-Ciocalteu (1:10 en agua),

incubando a 40°C por 2 minutos. Luego se agregaron 240 µL de una solución de carbonato de sodio (5% P/V) y la absorbancia fue medida a 765 nm luego de 20 minutos de reacción. Cabe destacar que esta metodología ha sido previamente modificada e implementada en nuestro laboratorio para ser llevada a cabo en el equipo lector de microplacas MultiSkan Go (ThermoScientific, Pittsburgh, EEUU) (Peña-Cerda, Arancibia-Radich, Valenzuela-Bustamante, Pérez-Arancibia, Barriga, Seguel, Garcia, & Delporte, 2017).

2.4 Determinación del perfil de fenoles presentes en los ES mediante cromatografía en capa fina

Con la finalidad de caracterizar cualitativamente el perfil de compuestos presentes en los EACs y EEAs, se llevó a cabo un análisis a través de cromatografía en capa fina (CCF). Esta técnica cromatográfica ha sido ampliamente utilizada en el análisis de la *'huella digital'* de extractos provenientes de productos naturales, principalmente de plantas. Esto se debe a que es una técnica simple, rápida, sensible y económica, que permite el análisis cualitativo y cuantitativo de diversos metabolitos secundarios en una gran cantidad de muestras de forma simultánea (Fichou, Ristivojevic, & Morlock, 2016; D. D. Joshi, 2012; Milojkovic Opsenica, Ristivojevic, Trifkovic, Vovk, Lusic, & Tesic, 2016). Para llevar a cabo este análisis se utilizaron cromatofolios de sílica RP-C18 en soporte de aluminio de un tamaño de 10 cm de ancho x 20 cm de largo (Merck®, Alemania).

Las muestras se resuspendieron en MeOH a una concentración de 2 mg/mL y se sembraron en los cromatofolios por contacto utilizando capilares de vidrio. El sembrado de las muestras se realizó a una distancia de 1 cm desde la base del cromatofolio, dejando 1 cm de distancia desde los extremos laterales. Además, se agregaron 3 patrones en los cromatofolios para analizar su posible presencia en los extractos analizados: quercetina, rutina y ácido gálico. Se desarrollaron las placas en una cámara de CCF (Camag®, Suiza) saturada con una fase móvil compuesta por H₂O, MeOH y HCOOH en una proporción de 5:4:0.1. El solvente recorrió una distancia total de 8 cm. Una vez desarrolladas los cromatofolios, se dejaron secar bajo campana a temperatura ambiente. En los cromatofolios secos se observaron las bandas obtenidas y se realizó un registro de los factores de retardo (R_f) y las coloraciones correspondientes.

El Rf se calculó de acuerdo con la siguiente fórmula:

$$Rf = D_s / D_f$$

Fórmula 2. Cálculo del factor de retardo (Rf). El Rf fue calculado considerando la distancia desde el punto de aplicación de la muestra (D_s) hasta el centro de la banda analizada. D_f corresponde a la distancia recorrida por el frente del solvente.

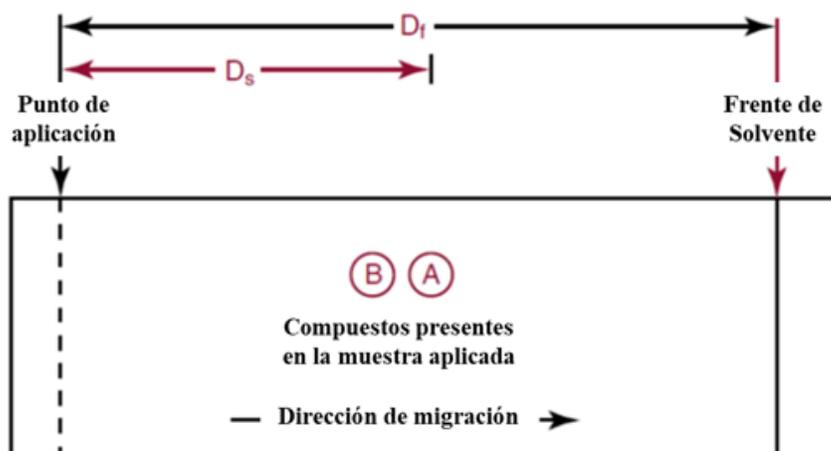


Figura 4. Representación de la separación de 2 compuestos (A y B) por CCF. D_s corresponde a la distancia desde el punto de aplicación hasta el centro de la banda analizada, D_f corresponde a la distancia recorrida por el frente de solvente y CCF = cromatografía en capa fina.

Posteriormente, se derivatizaron los componentes presentes en las CCF con el reactivo *Natural products-Polyethylene glycol* (NP/PEG) y se observaron bajo luz visible y luz UV (365 nm) registrando los Rf de las bandas y sus correspondientes coloraciones. Se realizaron registros fotográficos de las placas en todas las condiciones señaladas. Las condiciones cromatográficas se resumen en la Tabla 2.

Fase estacionaria	Fase móvil	Derivatizante
RP-C18 en soporte de aluminio	H ₂ O:MeOH:HCOOH = 5:4:0,1	NP/PEG; visible/UV 365nm

Tabla 2. Condiciones cromatográficas para análisis por CCF. La fase móvil y el revelador se utilizaron para el análisis de compuestos polares en las muestras analizadas. Donde, RP = fase reversa; MeOH = metanol; NP = *natural products*; PEG = polietilenglicol.

2.5 Análisis de componentes principales del perfil de compuestos presentes en los EACs y EEAs obtenido por CCF de alta resolución

2.5.1 Análisis del perfil de compuestos fenólicos en los EACs y EEAs por CCF de alta resolución

El análisis del perfil de compuestos químicos presentes en los EACs y EEAs de frutos de distintos genotipos de murtila por CCF de alta resolución se llevó a cabo en placas con soporte de vidrio y fase estacionaria Silica gel 60 F254 de tamaño 10 x 20 cm. Las muestras se resuspendieron en MeOH a una concentración de 2 mg/mL y fueron aplicadas sobre las placas con la utilización del *Automatic TLC Sampler* (CAMAG®) a través de pulverización (volumen final de aplicación = 40 µL). Un esquema del proceso de análisis por CCF de alta resolución se muestra en la **Figura 5** y el diseño de la aplicación se detalla en la **Figura 6**. Las placas fueron desarrolladas en un ambiente controlado (t° = 22°C; humedad relativa = 33%) en el equipo *Automatic Developer Chamber ADC2* (CAMAG®) previamente saturado con la fase móvil. Posteriormente las placas fueron derivatizadas en el equipo *CAMAG® Derivatizer*. Se tomaron fotografías de las placas luego de desarrolladas y también posterior a la derivatización bajo luz visible y UV (254 y 366 nm). Las fotografías fueron adquiridas en el *TLC Visualizer* (CAMAG®) y analizadas con el software *visionCATS* (CAMAG®) (**Figura 5**). Las condiciones cromatográficas del análisis se resumen en la **Tabla 3**.



Figura 5. Esquema del proceso automatizado de análisis por CCF de alta resolución con instrumentación CAMAG®. La aplicación de las muestras previamente resuspendidas se realizó con el equipo *Automatic TLC sampler 4* en placas de CCF de alta resolución en soporte de vidrio. Las placas fueron luego desarrolladas en el equipo *Automatic Developer Chamber ADC2* y fotografiadas en el equipo *TLC Visualizer*. La derivatización de las placas se llevó a cabo en el equipo *Derivatizer*.

Fase estacionaria	Fase Móvil	Derivatizante
Silica gel 60 F254 en soporte de vidrio	(1) AcOEt:HCOOH:CH ₃ COOH:H ₂ O = 100:11:11:27	(a) Reactivo NP (b) p-anisaldehido sulfúrico (pAs)
Silica gel 60 F254 en soporte de vidrio	(2) Tolueno:AcOEt = 8:2	(b) p-anisaldehido sulfúrico (pAs)

Tabla 3. Condiciones cromatográficas para análisis por CCF de alta resolución. Para el análisis del perfil químico por CCF de alta resolución se utilizaron placas de silica en soporte de vidrio y diferentes fases móviles y derivatizantes para dar cuenta tanto de la presencia de compuestos polares y apolares. La fase móvil (1) y los derivatizantes (a) y (b) se utilizaron para al análisis de compuestos polares. La fase móvil (2) y el derivatizante (b) se utilizó para el análisis de compuestos apolares.

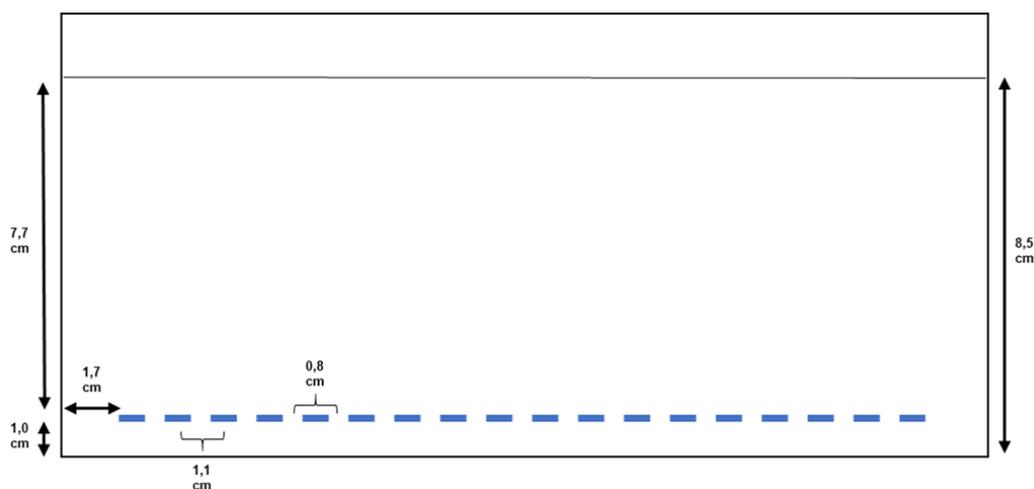


Figura 6. Diseño de aplicación de las muestras en las placas de CCF de alta resolución utilizando el *Automatic TLC Sampler (CAMAG®)*. Las muestras fueron aplicadas a través de pulverización a 1,7 cm de distancia del borde izquierdo de la placa y a 1 cm del borde inferior. El ancho de la aplicación fue de 0,8 cm y el centro de cada muestra se separa de la siguiente por 1,1 cm. El frente de solvente se ubicó a 8,5 cm del borde inferior de la placa y a 7,7 cm del punto de aplicación.

2.5.2 Extracción de los datos obtenidos por CCF de alta resolución con la aplicación rTLC para análisis de componentes principales

Para poder analizar los datos obtenidos, se utilizó la aplicación *rTLC* (<http://shinyapps.ernaehrung.uni-giessen.de/rtlc/>). Esta aplicación web de fuente abierta fue diseñada para el procesamiento de imágenes y análisis multivariado de cromatogramas obtenidos por CCF de alta resolución (Fichou, Ristivojevic, & Morlock, 2016). Esta plataforma permite al usuario subir las fotografías de sus cromatogramas, para luego procesar y transformar la información contenida en los píxeles de la imagen en una matriz de datos numéricos. El software es capaz de medir el promedio horizontal para cada píxel del cromatograma en los canales rojo, verde y azul (RGB, de sus siglas en inglés *Red, Green, Blue*), como también en escala de grises, la cual corresponde al promedio de los canales RGB. Las imágenes de interés fueron pre-procesadas con la técnica de *'warping'* (incluida en *rTLC*) con la finalidad de contrarrestar la variabilidad en el posicionamiento de las bandas debido a las variaciones de la fase móvil, la humedad, y la temperatura (**Figura 7**).

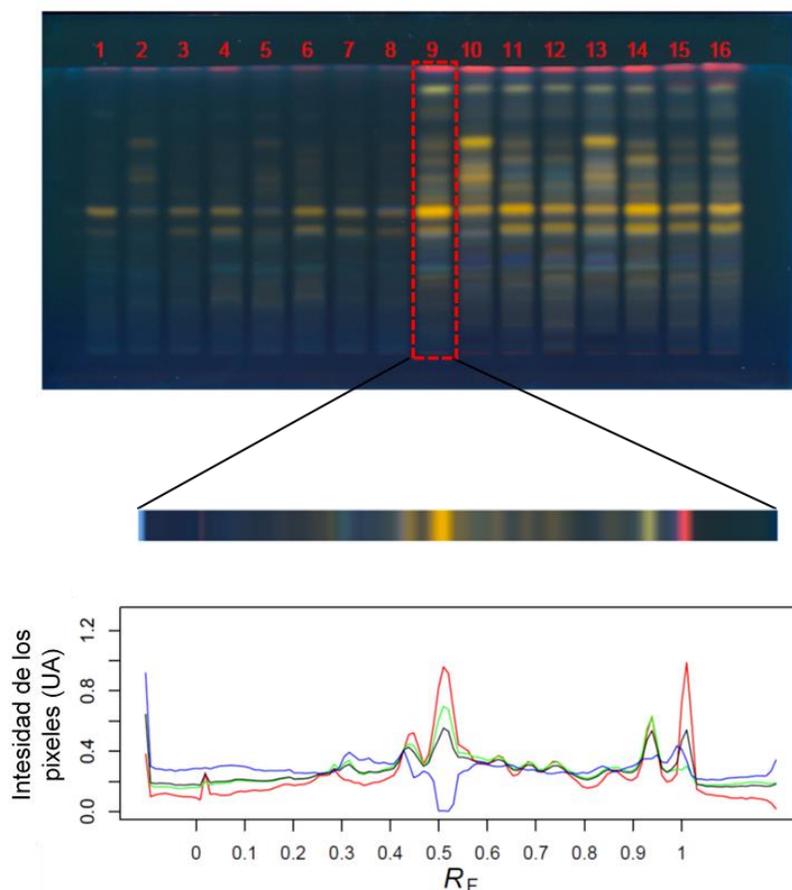


Figura 7. Esquema del procesamiento de las imágenes obtenidas a partir del análisis por CCF de alta resolución en rTLC. Las imágenes de las placas derivatizadas y observadas bajo luz UV a 365 nm fueron subidas a la plataforma rTLC donde se alinearon los carriles de cada una de las muestras analizadas para luego pre-procesar las imágenes utilizando la herramienta *warping*. Luego, se obtuvieron los datos de la intensidad de los píxeles para las señales en cada carril, datos que fueron exportados a una planilla Excel para el posterior análisis de componentes principales.

La matriz de datos numéricos obtenida a partir de las imágenes pre-procesadas fue exportada a una planilla Excel para su posterior análisis. Luego, con la finalidad de reconocer patrones en el perfil químico entre extractos analizados, se llevó a cabo un análisis de componentes principales (PCA, por sus siglas del inglés *Principal Component Analysis*) de los datos obtenidos en el canal de escala de grises utilizando el software SIMCA® (Ver. 15.0.2, *Umetrics*).

2.6 Análisis del perfil de compuestos fenólicos por cromatografía líquida de alta eficiencia acoplada a un arreglo de diodos (CLAE-DAD)

Para el análisis cromatográfico se utilizó una columna C18 analítica (250 mm x 4.6mm i.d., tamaño de partícula = 5 µm) y las siguientes fases móviles en gradiente (Pedro, Granato, & Rosso, 2016):

- i. **Fase A:** HCOOH 4,5% en agua MilliQ
- ii. **Fase B:** Acetonitrilo
- iii. **Flujo:** 1,0 mL/min
- iv. **Gradiente:**

Tiempo (minutos)	% Fase A	% Fase B
0	97	3
22	78	22
31	65	35
40	15	85
41	15	85
46	0	100
56	97	3
65	97	3

Tabla 4. Gradiente de solventes para el análisis mediante CLAE-DAD. Los solventes utilizados fueron ácido fórmico (HCOOH) al 4,5% en agua MilliQ (Fase A) y acetonitrilo (Fase B). El flujo de solventes fue de 1,0 mL/min. CLAE = cromatografía líquida de alta eficiencia; DAD = arreglo de diodos.

Para realizar la identificación tentativa de los compuestos polifenólicos presentes en los extractos analizados, se utilizaron patrones de referencia para comparar los tiempos de retención (t_r) y los máximos de absorbancia a 280 y 360 nm. Los patrones utilizados fueron: ácido gálico, ácido cafeico, rutina, miricetina, quercetina y canferol.

2.7 Estudios celulares

2.7.1 Cultivo celular

La línea celular HEK293 se obtuvo de la ATCC y se sembró en placas de 10 cm, manteniéndose en medio *Dulbecco's modified Eagle's medium* (DMEM) suplementado con 5 % de suero fetal bovino (FBS), glutamina, penicilina y estreptomicina, a 37°C en un incubador humidificado bajo 5% de CO₂ hasta 80% de confluencia.

2.7.2 Análisis de formación de inclusiones proteicas intracelulares en un modelo de transfección transiente utilizando una plataforma de análisis a gran escala

Una estrategia para el descubrimiento de extractos de productos naturales nativos de Chile con efectos neuroprotectores actualmente utilizada en el Laboratorio de Estrés Celular y Biomedicina de la Universidad de Chile, consiste en la utilización de la plataforma *Cellomics* de microscopia automatizada para el análisis del efecto de extractos de productos naturales sobre la agregación proteica anormal en líneas celulares. Así, a través de la utilización de la transfección de plasmidios se puede generar líneas celulares que expresan de manera transitoria un gen de interés. Este gen de interés puede codificar para una proteína relacionada a una enfermedad neurodegenerativa, como la HTT, y se puede acoplar a una proteína fluorescente para así poder monitorear la agregación proteica a través de plataformas de microscopía. La plataforma de análisis a gran escala *Arrayscan XTI (Cellomics)* de microscopía automatizada es única en Sudamérica y permite el análisis de un gran número de muestras y condiciones debido a que es compatible con la utilización de microplacas de distintos formatos además de detectar fluorescencia. Estas características permiten el rápido análisis de la formación de agregados proteicos intracelulares mediante la utilización de biosensores. En este ámbito, diversos estudios han reportado la utilización de modelos celulares para el estudio de la agregación de proteínas relacionadas a enfermedades neurodegenerativas (Apostol, Kazantsev, Raffioni, Illes, Pallos, Bodai, Slepko, Bear, Gertler, Hersch, Housman, Marsh, & Thompson, 2002; Harrington, Storey, Clunas, Harrington, Horsley, Ishaq, Kemp, Larch, Marshall, Nicoll, Rickard, Simpson, Sinclair, Storey, & Wischik, 2015).

Con la finalidad de analizar el efecto de los EACs y EEAs de frutos de distintos genotipos de murtila sobre la formación de agregados proteicos relacionados al desarrollo de la

EH, se utilizaron células HEK293 transfectadas transientemente con un péptido correspondiente a 79 repeticiones de glutamina acoplado a la proteína fluorescente verde (polyQ₇₉-EGFP). Este modelo fue adaptado para ser utilizado en un formato de 96 pocillos y llevar a cabo los análisis en el equipo Arrayscan XTI de *cellomics* (ThermoScientific, Pittsburgh, EEUU) realizando el cálculo del factor Z' de acuerdo a la fórmula señalada en el punto 2.7.3 para determinar la calidad del ensayo. La transfección transiente se llevó a cabo utilizando polietilenimina (PEI) de acuerdo con el siguiente protocolo:

1. Se sembraron 2 placas de 35 mm (p35) con 600.000 células HEK293 (placa control + placa polyQ₇₉-EGFP).
2. Luego de 24h, se tomaron 180 uL del medio de las células de cada placa y se mezcló con 10 uL de PEI y 2,5 o 5 µg de DNA (polyQ₇₉-EGFP). Para la placa control no se agregó DNA. La mezcla se sometió a vortex por 3 s y se incubó por 10 min a temperatura ambiente.
3. Luego de los 10 min, la mezcla se agregó a las células por goteo.
4. Luego de 4 h, las células se recolectaron, contaron y se re-sembraron en una placa de 96 pocillos a una confluencia de 10.000 células por pocillo.

Los análisis se llevaron a cabo a las 24 y 48 h post transfección, luego de incubar las células con Hoechst 33342 (30 min; concentración final = 0,1 µg/mL), en el equipo *Arrayscan XTI* de *cellomic*, utilizando el software HCS Studio®. Con el uso de la aplicación *Spot detector*, 9 imágenes por pocillo fueron obtenidas para la detección simultánea de los núcleos celulares (Hoechst 33342; excitación/emisión = 350/461 nm) y de inclusiones de polyQ₇₉-EGFP (GFP; excitación/emisión = 488/509). Los puntos de corte se ajustaron para la detección y cuantificación de inclusiones EGFP positivas, además del total de células que presentaran expresión de EGFP.

2.7.3 Cálculo del factor Z'

Con la finalidad de analizar la compatibilidad del modelo de transfección transitoria con un análisis HTS, se determinó el parámetro estadístico Z', que permite evaluar si las poblaciones celulares (células transfectadas vs células no transfectadas) son lo suficientemente diferentes para llevar a cabo un HTS, dando cuenta de la calidad del ensayo (J. Zhang, Chung, & Oldenburg, 1999). Este factor es un número adimensional

cuyos valores óptimos están entre 0,5 y 1. El cálculo del factor Z' se realizó utilizando la siguiente formula:

$$Z' = 1 - \frac{3DS \text{ PolyQ79} - 3DS \text{ NT}}{\text{Promedio PolyQ79} - \text{Promedio Control}}$$

Fórmula 3. Cálculo del factor Z'. DS NT corresponde a la desviación estándar de los agregados por célula de las células no transfectadas; promedio polyQ₇₉ corresponde al promedio de agregados por célula de las células transfectadas con polyQ₇₉; promedio NT corresponde al promedio de los agregados por célula de las células no transfectadas.

2.7.4 Análisis de la viabilidad celular en presencia de los EACs y EEAs

- I. Se monitoreó el número total de células utilizando la tinción nuclear 2'-[4'-etoxifenil]-5-[4-metilpiperazin-1-il]-2,5'-bis-1h-benzimidazol trihidrocloruro trihidrato (Hoechst 33342).
- II. En paralelo, la muerte celular se monitoreó a través de la sonda fluorescente 7-aminoactinomicina D (7-AAD) la cual se une a los ácidos nucleicos en aquellas células cuya membrana se ha permeabilizado, excluyéndose así las células vivas.

Fue posible realizar el análisis en paralelo, ya que ambos fluoróforos poseen máximos de emisión de fluorescencia a distintas longitudes de onda (647 nm para 7-AAD y entre 460 y 490 nm para Hoechst 33342). Para llevar a cabo esta determinación, se sembraron 10.000 células por pocillo en una placa de 96 pocillos, las cuales fueron expuestas a diferentes concentraciones de los extractos por 24 h, excepto por el control y el control con dimetilsulfóxido (DMSO). Una vez transcurridas las 24 h de tratamiento, las células se trataron con Hoechst 33342 (concentración final = 0,1 µg/mL) y 7-AAD (concentración final = 0,05 µg/mL) por 30 min, luego de lo cual se monitoreó la fluorescencia utilizando el equipo *Arrayscan XTI* de *cellomics* y el software HCS Studio®.

2.7.5 Análisis del efecto de los EACs y EEAs obtenidos a partir de los frutos de distintos genotipos de murtila de reducir el número de inclusiones de polyQ₇₉-EGFP

Las células HEK293 se transfectaron con el plasmidio que expresa el péptido polyQ₇₉-EGFP de acuerdo con lo señalado en el punto 2.7.2. Una vez sembradas las células

en placas de 96 pocillos, se esperó 4 h y se realizó el tratamiento con distintas concentraciones de los EACs y EAEs de los distintos genotipos de frutos de murtila. El análisis del número de inclusiones EGFP (+) se realizó a las 24 y 48 h post tratamiento. Para llevar a cabo el análisis, se realizó la tinción de los núcleos con el reactivo Hoechst 33342 (concentración final = 0,1 µg/mL) 15 a 30 min previo al análisis para así monitorear el número de células total (Hoechst) y el número de agregados de polyQ₇₉-EGFP utilizando la plataforma *cellomics* de microscopía automatizada. Se seleccionaron aquellos extractos que presentaron una capacidad significativa de reducir el número de inclusiones intracelulares de polyQ₇₉-EGFP para análisis posteriores.

2.7.6 Validación del efecto de los extractos seleccionados de reducir los niveles de especies de alto peso molecular de polyQ₇₉ y mHTT_{Q85}

Para la validación de la capacidad de los extractos seleccionados de reducir el número de agregados proteicos, se sembraron $1,5 \times 10^5$ células HEK293 en placas de 12 pocillos en medio DMEM suplementado con 5% de suero fetal bovino y 1% penicilina/estreptomina. Las células fueron transfectadas utilizando el reactivo TransIT® para analizar la formación de inclusiones intracelulares de polyQ₇₉-EGFP y mHTT_{Q85}-GFP luego de 16 h de tratamiento con los extractos seleccionados a una concentración de 100 µg/mL. El tratamiento se llevó a cabo por 16 h debido a que la expresión y formación de los agregados de polyQ₇₉ ocurre de forma rápida y agresiva. Además, se realizó el análisis del efecto del tratamiento con los extractos seleccionados sobre la expresión del péptido polyQ₁₁-EGFP como control, ya que la sobre expresión de este péptido no provoca la formación de inclusiones intracelulares.

2.7.6.1 Análisis por *Western blot*

Para el análisis a través de la técnica de *Western blot*, se recolectaron y homogeneizaron las células en buffer PBS 1x con Triton X-100 al 1% más inhibidores de proteasas y fosfatasa (Roche). La homogeneización de las células se llevó a cabo por sonicación (3 pulsos de 5 s). Una vez que las muestras fueron homogeneizadas, se llevó a cabo la determinación de la concentración de proteínas a través del ensayo de BCA (Pierce). 20-25 µg de proteínas totales de cada muestra fueron cargados en geles SDS-PAGE al 8% (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA) y posteriormente se llevó a cabo la transferencia en semi-seco a membranas de PVDF utilizando el equipo Trans-Blot Turbo

(Bio-Rad). Las membranas se bloquearon utilizando PBS con 5% de leche por 60 min a temperatura ambiente, y luego fueron incubadas con anticuerpos primarios en PBS con 5% de leche. Los siguientes anticuerpos primarios fueron utilizados: anti-GFP 1:1.000 (Santa Cruz, Cat. nº SC-9996), anti-HSP90 1:1.000 (Santa Cruz, Cat. nº SC-13119). Los anticuerpos unidos a las proteínas de interés fueron detectados utilizando anticuerpos secundarios acoplados a peroxidasa luego de incubar por 1-2 h a temperatura ambiente. Finalmente las membranas fueron reveladas con el sistema ECL y las imágenes fueron obtenidas hasta la saturación de las bandas de interés en el equipo Chemidoc (Bio-Rad) y luego analizadas con el software Image Lab (ver. 6.0.1, Bio-Rad).

2.8 Análisis por CLAE acoplada a espectrometría de masas de los extractos seleccionados

2.8.1 Identificación tentativa a 280, 360, y 520 nm de los compuestos fenólicos presentes en los extractos seleccionados

Con la finalidad de dar cuenta del perfil de compuestos fenólicos de aquellos extractos que redujeron significativamente el número de agregados de polyQ₇₉-EGFP, es que se realizó un análisis a través de la técnica de CLAE acoplada a espectrometría de masas (CLAE-UV-ESI-EM/EM). Para esto se utilizó un equipo de CLAE Agilent 1100 con una columna Hibar Purospher Star RP-18 (250 mm x4.6 mm), con detector UV y acoplado a un espectrómetro de masas de trampa de iones (IT) Esquire 4000 con una fuente de iones de electrospray (ESI) (Bruker Daltonics GmbH, DE). Las muestras se re-suspendieron en MeOH grado CLAE a una concentración de 10 mg/mL, sonicando hasta su completa disolución en tubos eppendorf de 1,6 mL. Se inyectaron al equipo 20 µL de cada muestra utilizando MeOH como blanco. La fase móvil utilizada y las condiciones del análisis se detallan en la Tabla 5.

El análisis de los compuestos fenólicos a las longitudes de onda de 280 y 360 nm se realizó en polaridad negativa, mientras que para la identificación de antocianinas se realizó el análisis a 520 nm en polaridad positiva. Tanto los cromatogramas como los espectros de masas obtenidos fueron analizados utilizando el software *Bruker DataAnalysis 3.2* (Bruker Daltonik GmbH, DE). La identificación de los compuestos se llevó a cabo a través de la comparación de las masas de los iones moleculares y sus

patrones de fragmentación con los datos de una librería de compuestos fenólicos provista por el *Centro de estudios para el desarrollo de la química* (CEPEDEQ) y la utilización de la base de datos *ReSpect for phytochemicals*, sumado a la revisión de literatura científica.

CONDICIONES CROMATOGRÁFICAS		
t (min)	B (%)	Columna: 250x4,6 mm
0,0	3,0	Fase móvil A: ácido fórmico 4.5% v/v
22,0	22,0	Fase móvil B: acetonitrilo
31,0	35,0	Flujo: 1,0 mL/min
40,0	85,0	Longitudes de onda: 280, 360, 520 nm
41,0	85,0	Volumen de inyección: 20 µL
46,0	100,0	Temperatura: 25°C
56,0	3,0	
65,0	3,0	

Tabla 5. Condiciones cromatográficas para la identificación de compuestos fenólicos por CLAE-UV-ESI-EM/EM. El análisis fue llevado a cabo en un equipo Agilent 1100 con una columna Hibar Purospher Star RP-18 (250 mm x4.6 mm), con detector UV y acoplado a un espectrómetro de masas IT Esquire 4000 con una fuente de iones ESI. Donde: t = tiempo; min = minutos; B = fase móvil B; nm= nanómetros.

2.8.2 Semicuantificación relativa de los compuestos fenólicos tentativamente identificados en los extractos seleccionados

Con la finalidad de realizar un análisis comparativo del perfil de compuestos fenólicos entre los extractos seleccionados, se llevó a cabo una semicuantificación relativa de cada compuesto identificado. Para esto, el ion molecular de cada compuesto identificado a 280 nm fue seleccionado mediante el modo *cromatograma de ion seleccionado* y luego se realizó la integración de sus áreas. Posteriormente, los datos fueron normalizados dividiendo el área del peak seleccionado por la suma del área de todos los peaks analizados. Finalmente, el peak con la mayor área relativa entre las muestras analizadas se definió con una concentración relativa de 100%.

2.9 Análisis estadístico

Los resultados fueron presentados como el promedio de tres determinaciones independientes más su desviación estándar (DS), a menos que se indique lo contrario.

La linealidad de la curva de calibración de ácido gálico fue determinada utilizando el *Lack of fit test* considerando que el modelo es lineal con un valor $p > 0,05$ ($F_{\text{calculado}} < F_{\text{tabulado}}$) y utilizando el valor de R^2 como una muestra de la correlación entre el eje de la variable independiente con el de la variable dependiente. La prueba ANOVA de una vía y el test de comparaciones múltiples de Tukey se utilizaron para analizar los resultados del CFT y la actividad farmacológica determinada en el equipo *cellomics* y a través de la técnica de *Western blot*; se consideró un $p \leq 0,05$ como significativo. La correlación de los resultados entre los diferentes ensayos farmacológicos y el CFT se determinaron a través del coeficiente de correlación lineal de Pearson (R), considerando como una buena correlación los valores mayores a 0,900. El análisis estadístico de los resultados experimentales se realizó utilizando el software GraphPad Prism® para Windows versión 6.01. El análisis de componentes principales (PCA) se llevó a cabo en el programa SIMCA® (Umetrics).

V. RESULTADOS

1. Rendimiento del proceso de extracción

En la siguiente tabla se resumen los rendimientos obtenidos para los extractos de los frutos de los 8 genotipos de *Ugni molinae*.

Genotipo	Código herbario	Peso inicial (g)	% EDCM	% ACE	% EEA
14-4	SQF 22549	200,0	1,3	3,1	12,7
19-1	SQF 22554	200,0	2,7	1,2	24,3
19-1 _{ha}	SQF 22553	200,0	2,4	1,3	23,4
19-2	SQF 22557	200,0	3,9	1,3	23,3
22-1	SQF 22552	200,0	2,4	2,8	23,1
23-2	SQF 22556	180,0	2,4	1,3	18,5
27-1	SQF 22555	200,0	1,6	1,8	22,5
31-1	SQF 22551	200,0	2,4	2,1	24,3

Tabla 6. Rendimiento obtenido para los extractos seriados de cada genotipo expresados como porcentaje (%) y código del testigo herbario del herbario SQF de la Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas de la Universidad de Chile. Los extractos obtenidos fueron llevados a completa sequedad utilizando un evaporador rotatorio a presión reducida y una estufa al vacío y luego fueron almacenados a -20°C hasta análisis posteriores. Los rendimientos obtenidos fueron calculados considerando el peso final de los extractos secos y el peso inicial del material vegetal liofilizado. EDCM: extracto diclorometano; EAC: extracto acetona; EET: extracto etanólico ácido.

Como se puede observar en la **Tabla 6**, los extractos que exhibieron los mayores rendimientos de extracción fueron los EEAs, promediando alrededor de un 22%, mientras que los EACs y EDCMs solo mostraron aproximadamente un 2% de rendimiento. Estas diferencias en el rendimiento de los extractos fueron significativas ($p < 0,05$) (**Figura 8**). Los EEAs 19-1 y 31-1 fueron los que presentaron los mayores rendimientos, con un 24,3%, mientras que el EEA 14-4 fue el que exhibió el menor rendimiento (12,7%). Respecto a los EACs, el genotipo que presentó el mayor rendimiento fue el 14-4 (3,1%), mientras que el EAC 19-1 fue el de menor rendimiento (1,2%). En el caso de los EDCMs, el genotipo 19-2 exhibió el mayor rendimiento, con un 3,9%, mientras que el EDCM del genotipo 14-4 fue el de menor rendimiento (1,3%).

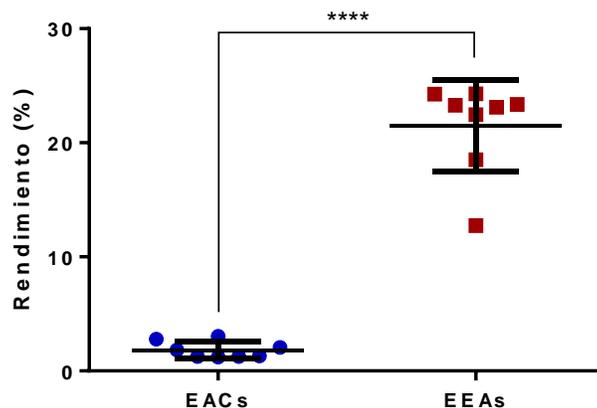


Figura 8. Rendimientos obtenidos por los EACs y EEAs de los diferentes genotipos analizados. Los rendimientos obtenidos fueron expresados como porcentaje y calculados considerando el peso final de los extractos secos y el peso inicial del material vegetal liofilizado. Las diferencias estadísticamente significativas fueron obtenidas realizando test t (**** = $p < 0,0001$). EAC = Extracto obtenido con acetona; EEA = Extracto obtenido con etanol acidificado.

2. Análisis espectrofotométrico del contenido de fenoles totales

El contenido de fenoles totales (CFT) de los EACs y EEAs se analizó a través de la técnica espectrofotométrica de Folin-Ciocalteu, técnica que es ampliamente utilizada para la determinación del contenido de compuestos fenólicos presentes en una gran variedad de matrices, tales como comidas, bebidas, diferentes hierbas y también en extractos provenientes de plantas (Margraf, Karnopp, Rosso, & Granato, 2015).

2.1. Curva de calibración de ácido gálico

La curva de calibración de ácido gálico (**Figura 9**) se utilizó para interpolar los resultados de las absorbancias obtenidas con los extractos para determinar el CFT. El CFT fue expresado en mg EAG/g ES.

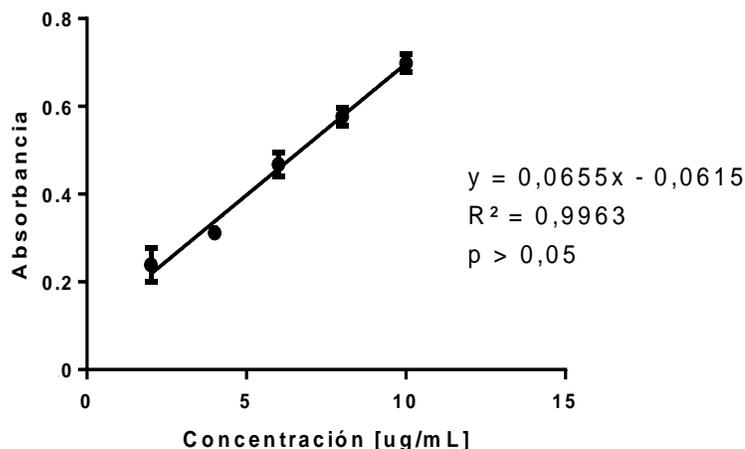


Figura 9. Curva de calibración de ácido gálico para la cuantificación del CFT por la técnica de Folin-Ciocalteu. Para preparar la curva de calibración se prepararon soluciones de ácido gálico en un rango de concentraciones entre 2 a 10 $\mu\text{g/mL}$. Los resultados son el promedio de 3 experimentos independientes. La linealidad se determinó a través del R^2 y la prueba de carencia de ajustes ($p > 0,05$). CFT = contenido de fenoles totales

2.2. Análisis del contenido de fenoles totales de los EACs

En la **Tabla 7** y **Figura 10** se resumen los valores de CFT de los EACs. Los resultados fueron expresados en mg EAG/g ES. Como se puede apreciar, los EACs que presentaron el mayor CFT fueron los EACs de los genotipos 22-1 y 19-1, con 107,7 y 102,2 mg EAG/g ES respectivamente, sin haber entre ellos una diferencia estadísticamente significativa. Este último (EAC 19-1) corresponde a la variedad Red Pearl INIA. Por otro lado, el EAC 27-1, que corresponde a la variedad South Pearl INIA, fue el que presentó el menor CFT con 69,0 mg EAG/g ES, valor que es significativamente menor ($p < 0,05$) a las concentraciones obtenidas por los EACs de los demás genotipos.

Extracto	CFT (mg EAG/g ES) ± DS
EAC 14-4	95,2 ± 6,4 ^{a,b,c}
EAC 19-1	102,2 ± 10,3 ^{a,b,c}
EAC 19-1 ha	93,4 ± 4,1 ^{a,b,c}
EAC 19-2	91,4 ± 8,7 ^{a,b,c}
EAC 22-1	107,7 ± 7,8 ^{a,b}
EAC 23-2	93,9 ± 0,5 ^{a,b,c}
EAC 27-1	69,0 ± 1,9 ^d
EAC 31-1	87,0 ± 2,3 ^{c,d}

Tabla 7. CFT de los EACs de los frutos de distintos genotipos de murtila. El CFT de los EACs se obtuvo a través del análisis espectrofotométrico de Folin-Ciocalteu, interpolando los resultados obtenidos en una curva de calibración de ácido gálico y expresando los resultados como mg EAG/ g ES. Los resultados se expresan como el promedio de 3 experimentos independientes ± la DS. Letras distintas representan diferencias significativas ($p < 0,05$) por análisis ANOVA de 1 vía con test de comparaciones múltiples de Tukey. EAC: extracto de acetona; CFT: contenido de fenoles totales; EAG: equivalentes de ácido gálico; ES: extracto seco.

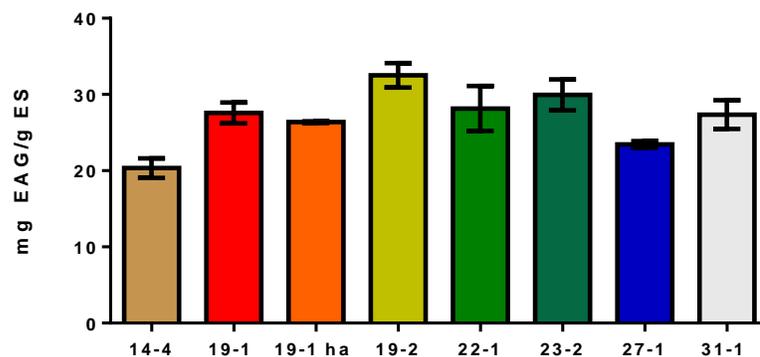


Figura 10. CFT de los EACs de frutos de distintos genotipos de murtila. El CFT de los EACs se obtuvo a través del análisis espectrofotométrico de FC, interpolando los resultados obtenidos en una curva de calibración de ácido gálico y expresando los resultados como mg EAG/ g ES. Los resultados se expresan como el promedio de 3 experimentos independientes ± la DS. EAC: extracto de acetona; CFT: contenido de fenoles totales; EAG: equivalentes de ácido gálico; ES: extracto seco.

2.3. Análisis del contenido de fenoles totales de los EEAs

Como se puede observar en la **Tabla 8** y **Figura 11**, el EEA del genotipo 19-2 fue el que presentó el mayor CFT entre los EEAs (32,5 mg EAG/ g ES), sin embargo, su CFT no es estadísticamente diferente ($p > 0,05$) al valor exhibido por los EEAs de los genotipos 22-1, 23-2 y 19-1, correspondiendo este último a la variedad South Pearl INIA. El EEA 14-4 fue el que exhibió el menor valor de CFT entre los EEAs, valor que fue estadísticamente diferente a los demás EEAs analizados (**Tabla 8; Figura 11**). Además, hubo diferencias significativas ($p < 0,0001$) en el promedio de los CFT obtenidos para los EACs y EEAs (**Figura 12**). Como se puede observar en la **Figura 12**, los EACs exhibieron mayores valores de CFT, promediando alrededor de 92,0 mg EAG/ g ES, mientras que el CFT de los EEAs en promedio fue de un valor cercano a 27,0 mg EAG/ g ES.

Extracto	CFT (mg EAG/g ES) \pm DS
EEA 14-4	20,3 \pm 1,3 ^a
EEA 19-1	27,6 \pm 1,4 ^{b,c}
EEA 19-1 ha	26,4 \pm 0,1 ^b
EEA 19-2	32,5 \pm 1,6 ^c
EEA 22-1	28,2 \pm 2,9 ^{b,c}
EEA 23-2	30,0 \pm 2,0 ^{b,c}
EEA 27-1	23,5 \pm 0,4 ^{a,b}
EEA 31-1	27,4 \pm 1,9 ^b

Tabla 8. CFT de los EEAs de los frutos de distintos genotipos de murtila. Los resultados se expresan como el promedio de 3 experimentos independientes \pm la DS. El CFT de los EEAs se obtuvo a través del análisis espectrofotométrico de FC, interpolando los resultados obtenidos en una curva de calibración de ácido gálico y expresando los resultados como mg EAG/ g ES. Letras distintas representan diferencias significativas ($p < 0,05$) por análisis ANOVA de 1 vía con test de comparaciones múltiples de Tukey. EAC: extracto de acetona; CFT: contenido de fenoles totales; EAG: equivalentes de ácido gálico; ES: extracto seco.

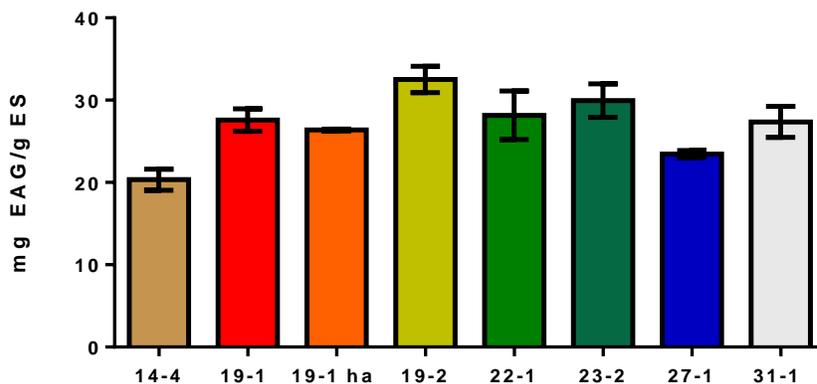


Figura 11. CFT de los EEAs de frutos de distintos genotipos de murtila. Los resultados se expresan como el promedio de 3 experimentos independientes \pm la DS. El CFT de los EEAs se obtuvo a través del análisis espectrofotométrico de FC, interpolando los resultados obtenidos en una curva de calibración de ácido gálico y expresando los resultados como mg EAG/ g ES. EAC: extracto de acetona; CFT: contenido de fenoles totales; EAG: equivalentes de ácido gálico; ES: extracto seco.

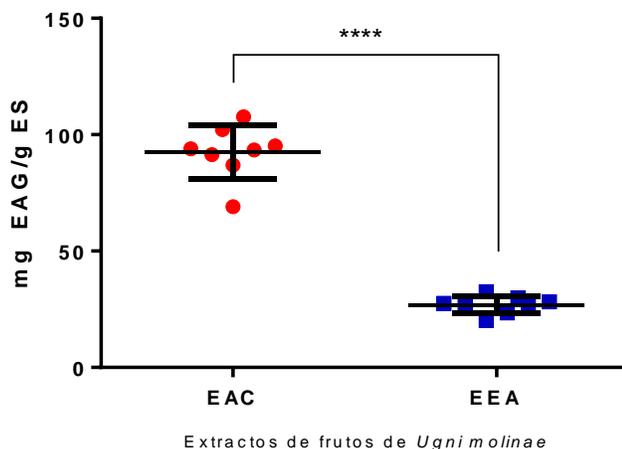


Figura 12. Comparación del CFT entre los EACs y EEAs para los frutos de distintos Gs de murtila. EL CFT de los EACs y EEAs fue analizado a través de la técnica de Folin-Ciocalteu y los resultados fueron expresados como EAG/ mg ES. Los resultados representan el promedio de 3 experimentos independientes. CFT = contenido de fenoles totales; EAC = extracto de acetona; EEA = extracto de etanol acidificado; EAG = equivalentes de ácido gálico; ES = extracto seco. Las diferencias estadísticamente significativas fueron obtenidas realizando test t (****: $p < 0,0001$)

Previamente en nuestro laboratorio se estudió la composición química de extractos provenientes de las hojas de 10 genotipos de murtila cultivados bajo las mismas condiciones edafoclimáticas en el INIA, Carillanca. 8 de aquellos genotipos corresponden a los mismos genotipos analizados en este proyecto. A partir de las hojas de murtila secas y trituradas, se obtuvieron 4 extractos seriados con Hexano (EHX), diclorometano (EDCM), acetato de etilo (EAE) y etanol (EET). En promedio, los EAEs y EETs de las hojas exhibieron un CFT de 61,7 y 200,5 mg EAG/g ES (Arancibia-Radich et al., 2016; Peña-Cerda et al., 2017). Esto refleja, de forma general, que el CFT de los frutos de murtila es menor al CFT de las hojas (**Figura 13**).

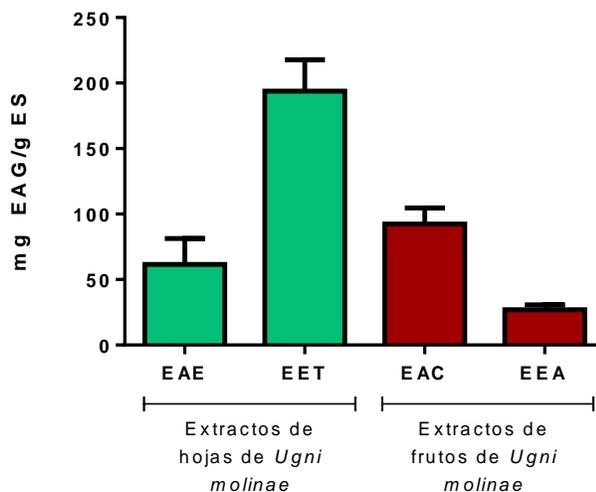


Figura 13. CFT promedio de los extractos de hojas y frutos de *Ugni molinae*. Los extractos de hojas fueron obtenidos por maceración del material vegetal seco y triturado con solventes de polaridad creciente y su CFT fue analizado a través de la técnica de FC, expresando los resultados obtenidos como mg EAG/ g ES. EAG = equivalente de ácido gálico; ES = extracto seco; EAE= extracto obtenido con acetato de etilo; EET; extracto obtenido con etanol; EAC = extracto obtenido con acetona; EEA = extracto obtenido con etanol acidificado.

Resumiendo, se observaron diferencias significativas en el CFT de los extractos obtenidos a partir de distintos genotipos de murtila (**Figura 10 y 11**). Además, los EACs presentaron valores de CFT significativamente mayores a los EEAs (**Figura 12**). Sin embargo, los resultados observados para los extractos de frutos fueron menores a aquellos valores observados en los extractos de hojas de los mismos genotipos de murtila.

3. Perfil fenólico mediante CCF de los extractos de frutos de murtila

Para el análisis por CCF se utilizaron placas de sílica G₆₀ de fase reversa (RP-18) y una fase móvil compuesta por metanol (MeOH), agua, y ácido fórmico en una proporción de 5:4:0,1. Además se utilizaron los patrones de quercetina (Q), rutina (R) y ácido gálico (AG), con la finalidad de determinar la presencia tentativa de éstos en los extractos a través de la comparación de sus factores de retardo (Rf), coloración luego de la derivatización con el reactivo NP/PEG, y también la coloración de su fluorescencia bajo luz UV (365 nm). En las **Figuras 14 y 15** se pueden apreciar las CCFs obtenidas para los EACs y EEAs. Estos cromatogramas fueron derivatizados con el reactivo NP/PEG para intensificar la fluorescencia de los compuestos presentes en los extractos, y analizarlos bajo luz UV a 365 nm de manera visual. En las **Figuras 14 y 15** también se puede observar la presencia de bandas de color rosado (Rf ~ 0,3) bajo luz visible, las que son más intensas en los EACs (**Figura 14A**) y en el EEA 19-1. Estas bandas corresponden a la presencia de antocianinas en los extractos (Wagner & Bladt, 1996). Luego del revelado con el reactivo NP-PEG, se puede observar la presencia de diversas bandas de coloración anaranjado-amarillo (Rf ~ 0,14) y algunas de coloración verde (Rf ~ 0,3) bajo la luz visible con un perfil similar para los EACs y EEAs (**Figura 14B y 15B**). Al observar bajo luz UV a 365 nm, se puede observar la presencia de diferentes bandas con coloraciones amarillo-verdoso (Rf ~ 0,5-1,0), anaranjadas-amarillas (Rf ~ 1,5), amarillas (Rf ~ 0,5), verdes (Rf ~ 0,36) y azules (Rf ~ 0,87), sin que hayan diferencias significativas en los perfiles de los EACs y EEAs (**Figura 14C y 15C**). Las coloraciones anaranjado-amarillas podrían corresponder a la presencia de flavonoles tales como quercetina, miricetina y sus derivados glicosilados, o flavonas como la apigenina y sus derivados glicosilados (Wagner & Bladt, 1996). Las bandas amarillo-verdosas podrían corresponder a flavonoides del tipo flavonas como la luteolina y sus derivados glicosilados, o flavonoles como canferol, isoramnetina y sus derivados glicosilados (Wagner & Bladt, 1996).

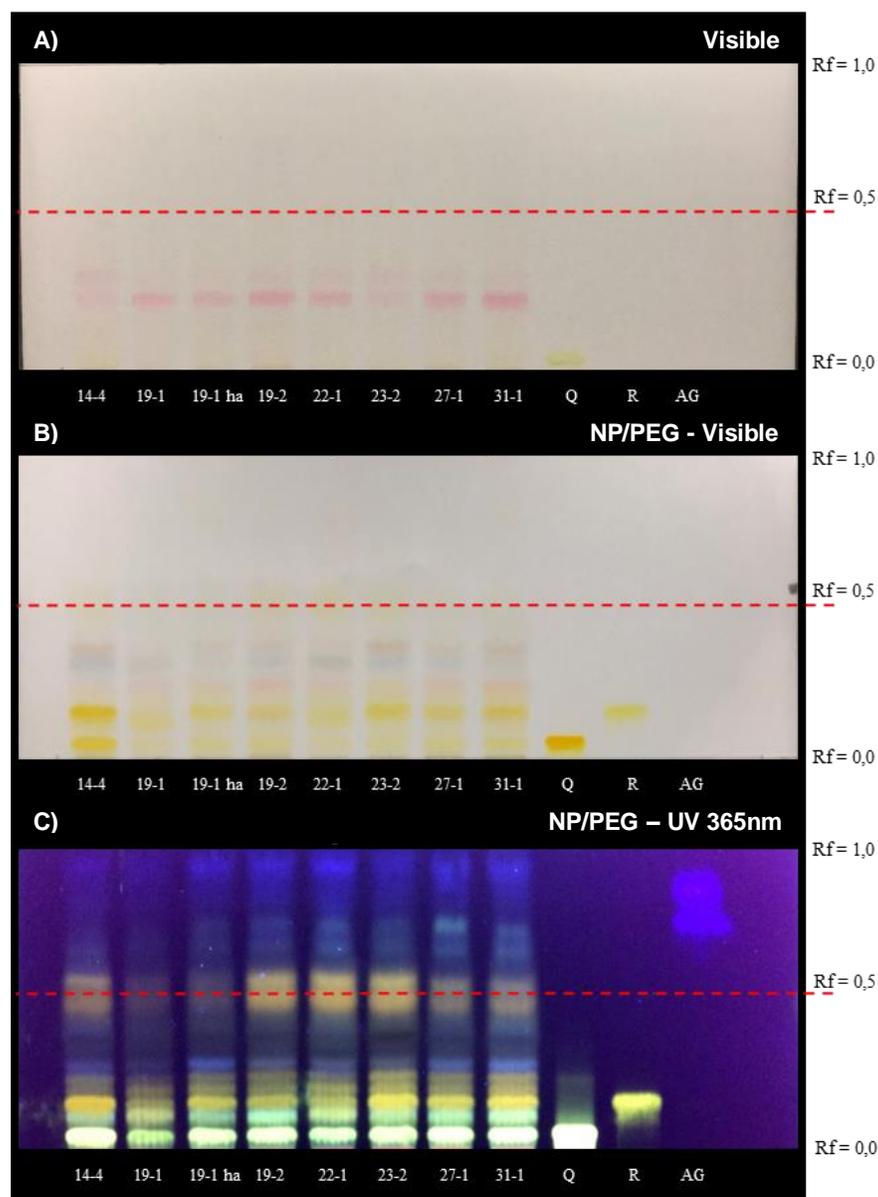


Figura 14. CCF de los EACs de frutos de distintos genotipos de murtila. Las CCF se llevaron a cabo en placas de sílica fase reversa (RP-18) utilizando una mezcla de H₂O:MeOH:HCOOH (5:4:0,1) como fase móvil. Las muestras se aplicaron por contacto sobre la placa utilizando capilares de vidrio. Las placas desarrolladas se derivatizaron con el reactivo NP/PEG y luego se registraron imágenes bajo luz visible y luz UV (365 nm). **A)** Cromatograma analizado bajo luz visible. **B)** Cromatograma analizado bajo luz visible luego de revelar con NP/PEG. **C)** Cromatograma analizado bajo luz UV (365 nm) luego de revelar con NP/PEG. Q = quercetina; R = rutina; AG = ácido gálico; Rf = factor de retardo; NP/PEG = 2-aminoetil-difenilborato – polietilenglicol.

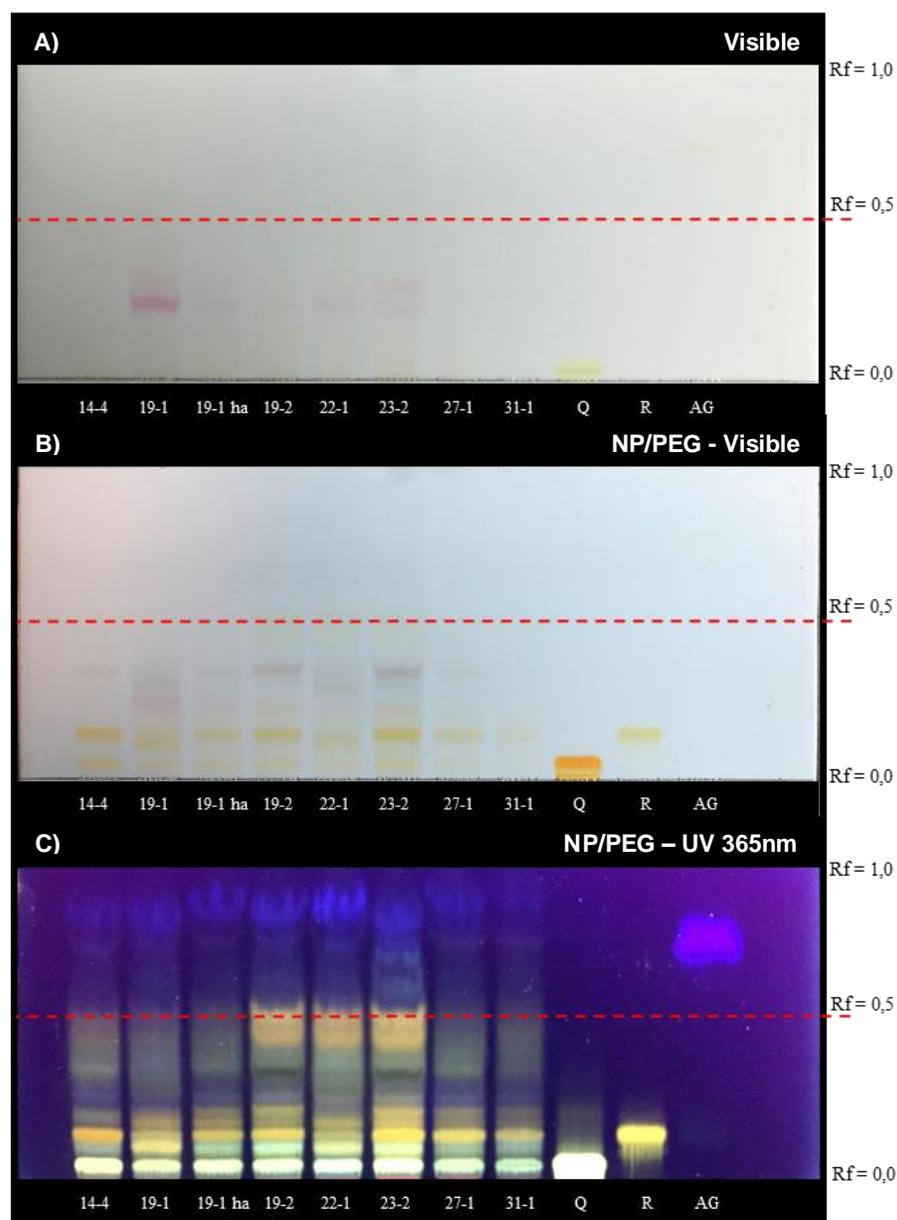


Figura 15. CCF de los EEs de frutos de distintos genotipos de murtila. A) Cromatograma analizado bajo luz visible. Las CCF se llevaron a cabo en placas de sílica fase reversa (RP-18) utilizando una mezcla de H₂O:MeOH:HCOOH (5:4:0,1) como fase móvil. Las muestras se aplicaron por contacto sobre la placa utilizando capilares de vidrio. Las placas desarrolladas se derivatizaron con el reactivo NP/PEG y luego se registraron imágenes bajo luz visible y luz UV (365 nm). **B)** Cromatograma analizado bajo luz visible luego de revelar con NP/PEG. **C)** Cromatograma analizado bajo luz UV (365 nm) luego de revelar con NP/PEG. Q = quercetina; R = rutina; AG = ácido gálico; Rf = factor de retardo; NP/PEG = 2-aminoetil-difenilborato – polietilenglicol.

El Rf de la quercetina fue de ~ 0,05, el de la rutina ~ 0,14 y la del ácido gálico ~ 0,75. Al comparar los Rf de los patrones analizados, se pudo establecer la presencia tentativa de quercetina (Rf ~ 0,05) y rutina (Rf ~ 0,14) en los EACs y EEAs obtenidos desde los frutos de distintos Gs de murtila, lo que se puede apreciar claramente en la **Figura 16**. Además de la CCF, la variabilidad química de los extractos de frutos de murtila fue analizada por CCF de alta resolución complementada por un PCA. Los resultados de estos experimentos se muestran en la siguiente sección.

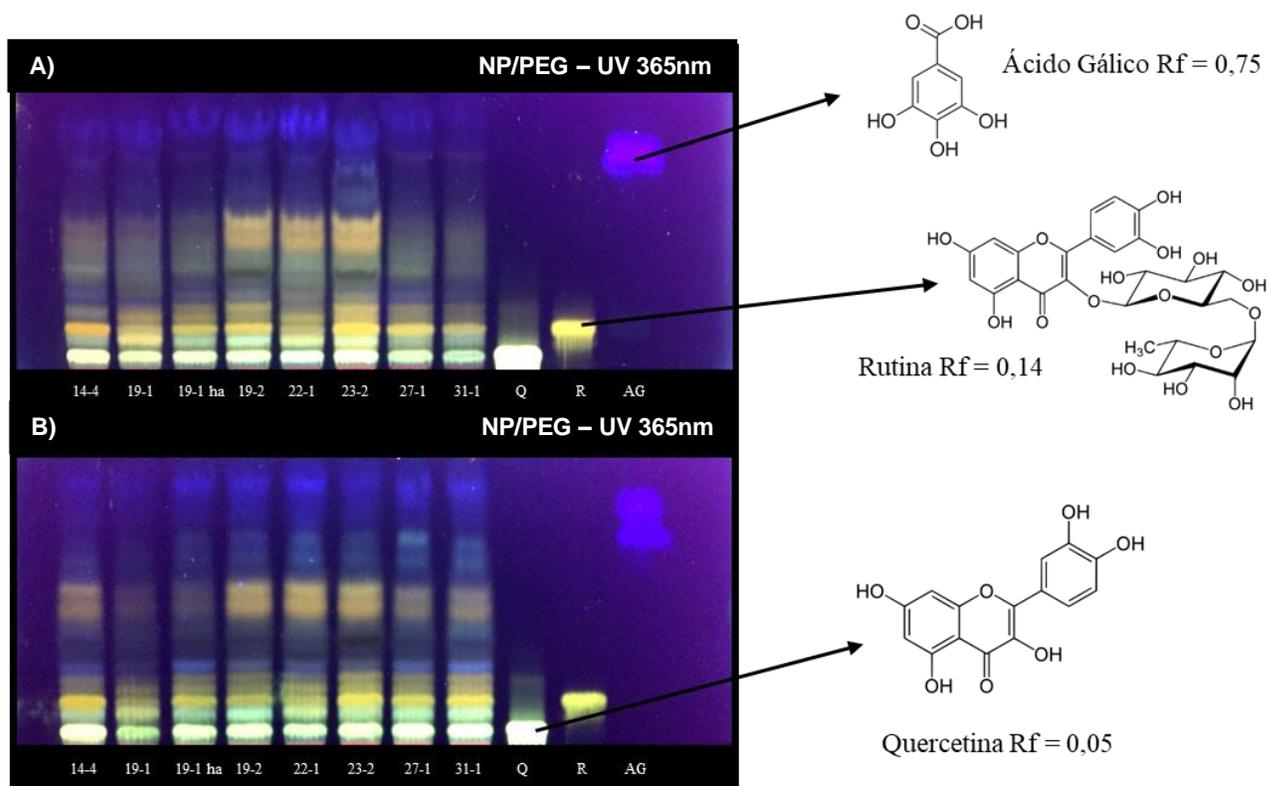


Figura 16. CCF comparativa de los EEAs y EACs de frutos de distintos genotipos de murtila y patrones de compuestos fenólicos. Las CCF se llevaron a cabo en placas de sílica fase reversa (RP-18) utilizando una mezcla de H₂O:MeOH:HCOOH (5:4:0,1) como fase móvil. Las muestras se aplicaron por contacto sobre la placa utilizando capilares de vidrio. Las placas desarrolladas se derivatizaron con el reactivo NP/PEG y luego se registraron imágenes bajo luz UV (365 nm). **A)** CCF de los EEAs revelado con NP/PEG y analizado con luz UV a 365 nm. **B)** CCF de los EACs revelado con NP/PEG y analizado con luz UV a 365 nm. Rf = factor de retardo; Q = quercetina; R = rutina; AG = ácido gálico; NP/PEG = 2-aminoetil-difenilborato – polietilenglicol.

4. Análisis del perfil de compuestos presentes en los EACs y EEAs mediante CCF de alta resolución y análisis de componentes principales

4.1 Análisis del perfil de compuestos fenólicos por CCF de alta resolución

Para llevar a cabo este análisis, se utilizaron placas de sílica en soporte de vidrio y equipos que permitieron la automatización de la aplicación de las muestras en las placas, el desarrollo de éstas y también su derivatización (**Figura 5**). Se utilizaron 2 fases móviles para el análisis de las muestras: la fase móvil (1) para dar cuenta de moléculas de carácter más polar, y la fase móvil (2) para dar cuenta de metabolitos secundarios de menor polaridad. Las placas derivatizadas fueron fotografiadas bajo luz visible y luz UV (254 nm y 366 nm, respectivamente) y los resultados se muestran en las **Figuras 17, 18, y 19**. Como se puede observar en las figuras mencionadas, el perfil de compuestos fenólicos presentes en los EEAs y EACs presenta claras diferencias en términos de la intensidad de las bandas obtenidas ya que los EACs presentan bandas más intensas que los EEAs. Sin embargo, también es posible observar bandas que están presentes en ambos sets de extractos, como por ejemplo la banda de color amarillo-anaranjado que se observa a $R_f \sim 0,5$ (**Figura 18**), que correspondería a un compuesto del tipo flavonoide, más específicamente a un flavonol (Wagner & Bladt, 1996), siendo estas bandas más intensas en los EACs.

En el caso de la placa desarrollada con la fase móvil (2), podemos observar y analizar la presencia de compuestos de menor polaridad. Al igual que con las placas desarrolladas con la fase móvil (1) (**Figuras 17 y 18**), la intensidad y número de bandas obtenidas es mayor en los EACs en comparación a los EEAs (**Figura 19B y 19C**). Al observar la placa desarrollada y derivatizada con pAS bajo luz visible (**Figura 19B**), es posible observar un número relativamente menor de bandas de coloración principalmente violeta y algunas de color azulado que podrían corresponder a la presencia de terpenos (Wagner & Bladt, 1996). Luego de derivatizar y observar la placa bajo luz UV (366 nm) (**Figura 19C**), se pueden observar bandas de coloración gris y amarillo verdoso entre los R_f s 0,0 y 0,4, mientras que a R_f s sobre los 0,45 se puede observar la presencia de bandas rojas y rosadas que podrían corresponder a la presencia de saponinas triterpénicas (Wagner & Bladt, 1996).

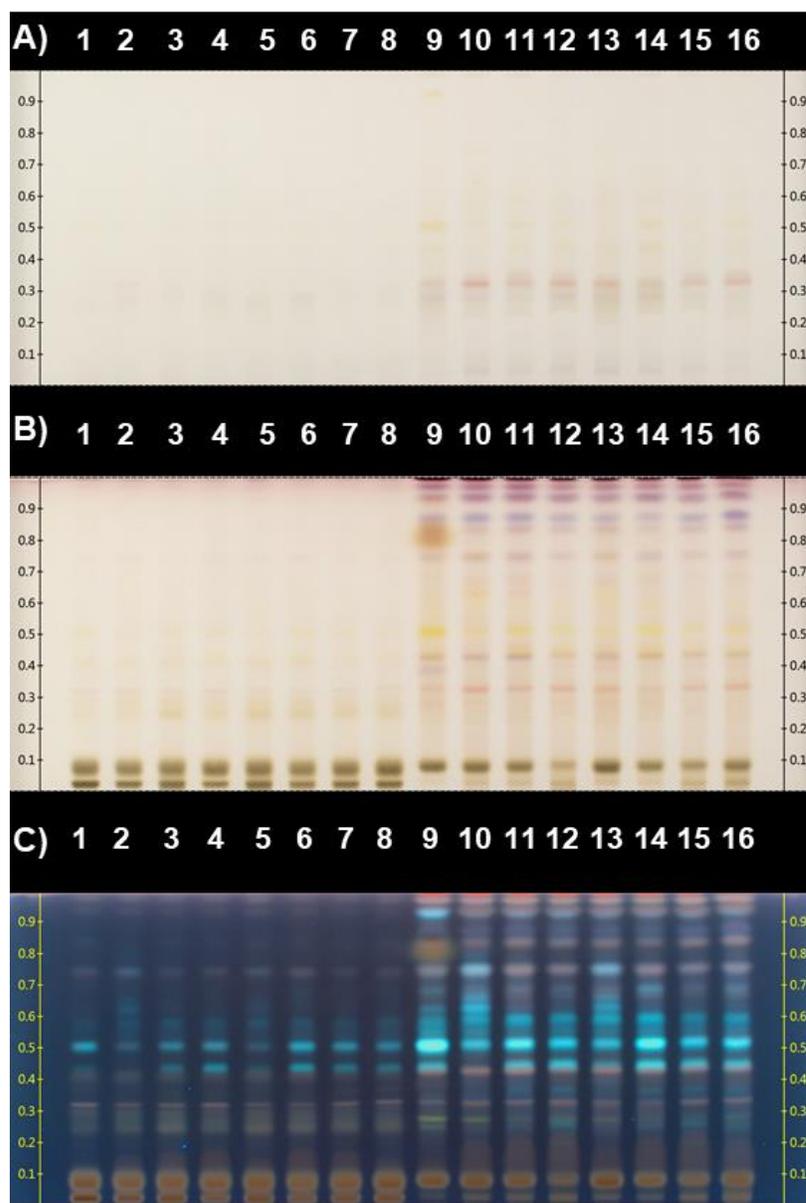


Figura 17. CCF de alta resolución de los EEAs y EACs de los frutos de distintos genotipos de murtila. El análisis se realizó en placas de sílica en soporte de vidrio y las muestras fueron cargadas por pulverización. La placa se desarrolló con la fase móvil (1) y se derivatizó con pAS. Las imágenes se registraron bajo luz visible y bajo luz UV (366 nm). Carriles 1 a 8 corresponden a los EEAs y carriles 9 a 16 a los EACs. Los extractos se sembraron en orden desde el 14-1 al 31-1 **A)** Cromatograma analizado bajo luz visible. **B)** Cromatograma analizado bajo luz visible luego de revelar con pAS. **C)** Cromatograma analizado a 366 nm luego de revelar. ET = extracto etanólico ácido; AC= extracto de acetona; pAS = p- anisaldehído sulfúrico.

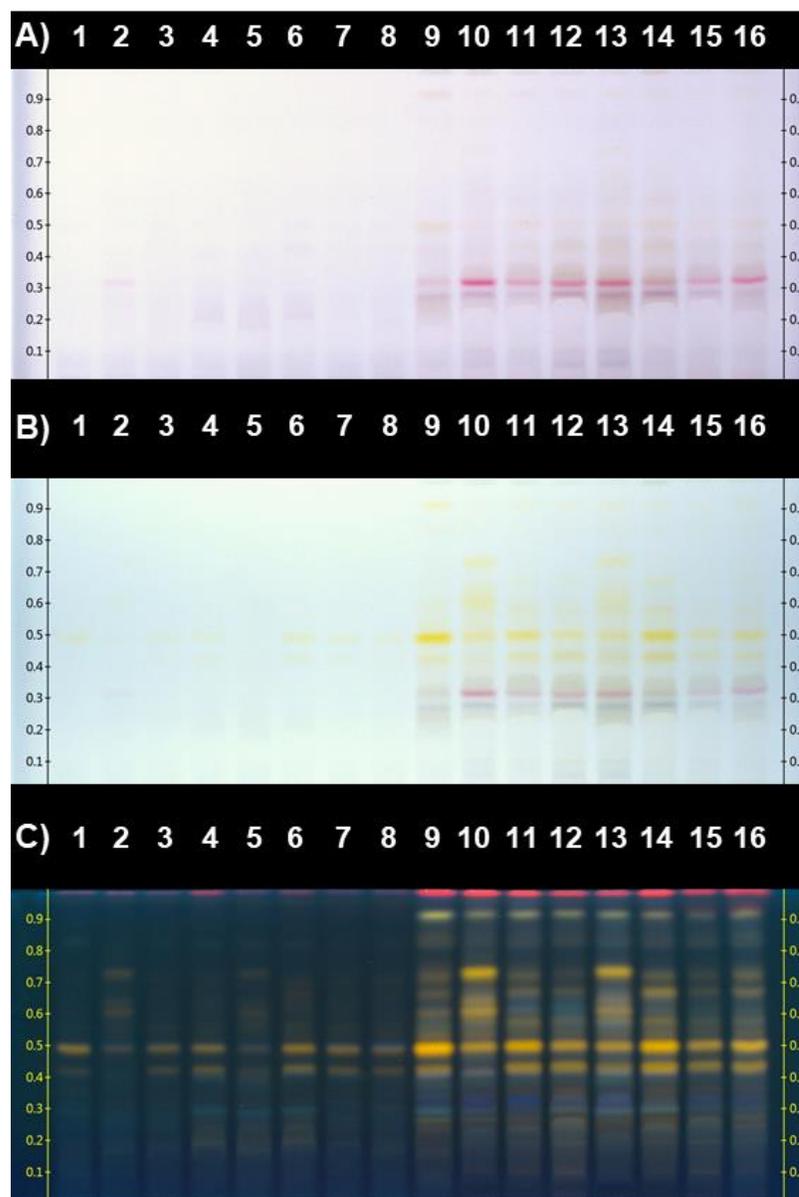


Figura 18. CCF de alta resolución de los EEAs y EACs de los frutos de distintos genotipos de murtila. El análisis se realizó en placas de sílica en soporte de vidrio y las muestras fueron cargadas por pulverización. La placa se desarrolló con la fase móvil (1) y se derivatizó con NP. Las imágenes se registraron bajo luz visible y bajo luz UV (366 nm). Carriles 1 a 8 corresponden a los EEAs y carriles 9 a 16 a los EACs. Los extractos se sembraron en orden desde el 14-1 al 31-1 **A)** Cromatograma analizado bajo luz visible. **B)** Cromatograma analizado bajo luz visible luego de revelar con reactivo NP. **C)** Cromatograma analizado a 366 nm luego de revelar. ET = extracto etanólico ácido; AC= extracto de acetona; NP = reactivo *natural products*.

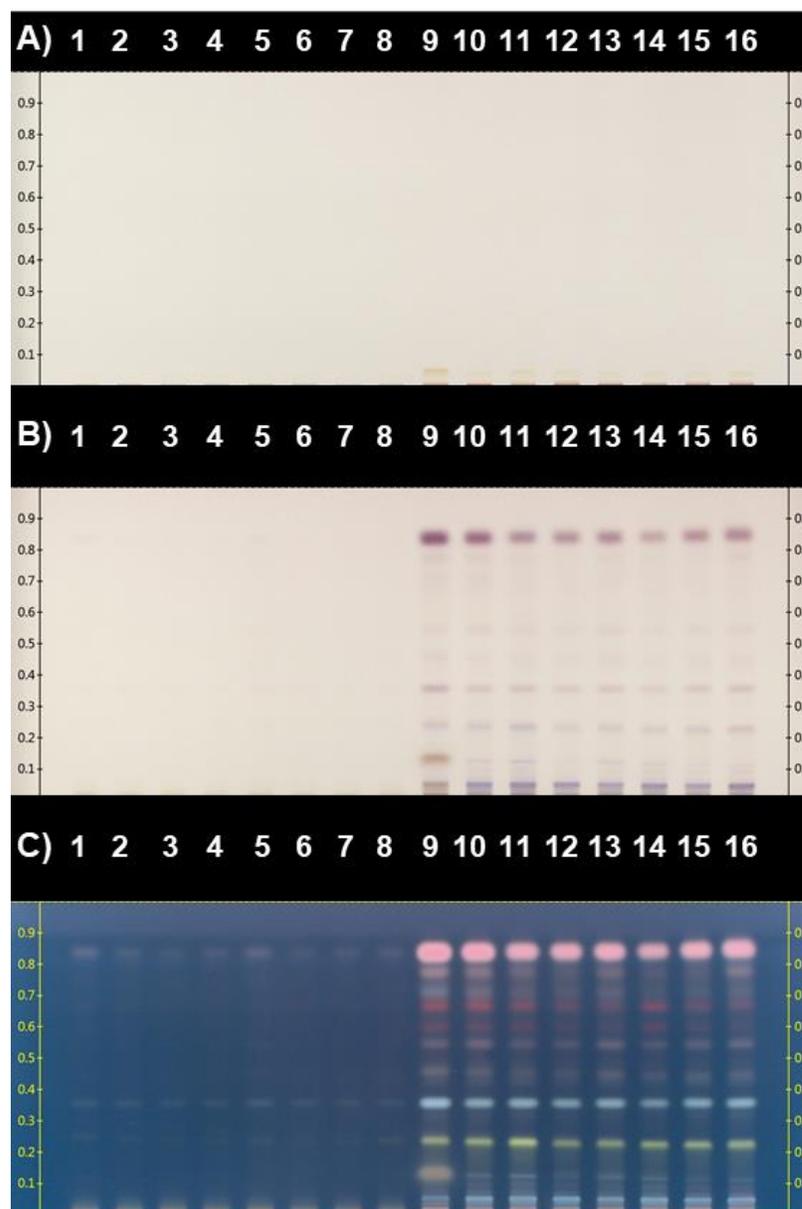


Figura 19. CCF de alta resolución de los EEAs y EACs de los frutos de distintos genotipos de murtillo. El análisis se realizó en placas de sílica en soporte de vidrio y las muestras fueron cargadas por pulverización. La placa se desarrolló con la fase móvil (2) y se derivatizó con pAS. Las imágenes se registraron bajo luz visible y bajo luz UV (366 nm). Carriles 1 a 8 corresponden a los EEAs y carriles 9 a 16 a los EACs. Los extractos se sembraron en orden desde el 14-1 al 31-1 **A)** Cromatograma analizado bajo luz visible. **B)** Cromatograma analizado bajo luz visible luego de revelar con pAS. **C)** Cromatograma analizado a 366 nm luego de revelar. ET = extracto etanólico ácido; AC= extracto de acetona; pAS = p- anisaldehido sulfúrico.

Posteriormente, las imágenes bajo luz UV (366 nm) de las placas desarrolladas y derivatizadas fueron cargadas en la plataforma rTLC para así extraer una matriz numérica desde los canales RGB y el canal en escala de grises. Los datos obtenidos fueron analizados utilizando el software SIMCA® (Umetrics). Los resultados obtenidos y los respectivos análisis se exponen a continuación.

4.2 Análisis de componentes principales de los resultados obtenidos por CCF de alta resolución

Para realizar un análisis más preciso de los resultados obtenidos a partir de las CCF de alta resolución, se llevó a cabo un análisis de componentes principales (PCA). Con este fin, se realizó la extracción de los datos contenidos en los píxeles de las bandas obtenidas en cada cromatograma desarrollado y derivatizado con pAS y NP, y observados a 366 nm. La finalidad del PCA es el de reducir la dimensionalidad de la matriz de datos obtenidos para dar cuenta de patrones en el perfil químico que pudieran estar relacionados a variables tales como la zona de recolección, criterios de selección, genotipos, entre otros. Estos patrones se ven reflejados en la agrupación y separación de las muestras en los gráficos obtenidos. Los resultados obtenidos se presentan en las **Figuras 20, 21 y 22**.

En las **Figura 20 y 21** se puede apreciar el gráfico resultante del PCA a partir del estudio químico por CCFAR de los compuestos fenólicos presentes en los EACs (verdes) y EEAs (azules) de los frutos de distintos genotipos de murtilla. En ambos casos la componente principal 1 (PC1) representa más del 70% de la variabilidad entre las muestras analizadas, mientras que la componente principal 2 (PC2) solo representa alrededor de un 12% de variabilidad. Por lo tanto, la separación de las muestras en el eje del PC1 nos indica que existen mayores diferencias en sus perfiles químicos en comparación a la separación en el eje del PC2. Así, podemos observar claramente la separación en el eje del PC1 de 2 los grupos de extractos representados por los círculos verdes y azules. Los resultados del análisis por PCA nos ayudan a confirmar las diferencias observadas entre ambos sets de extractos (EACs y EEAs) luego del análisis por CCFAR, lo que se refleja claramente en la agrupación de ambos sets de extractos en el eje del PC1, pero además nos permite dar cuenta de la variabilidad que existe entre los genotipos analizados, lo que se refleja de mejor manera en la separación de las muestras en el eje del PC2.

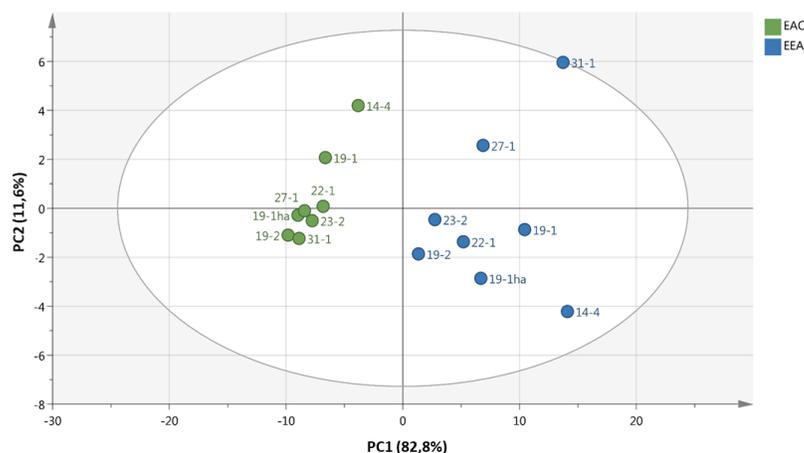


Figura 20. PCA de los datos obtenidos a partir de la placa de CCF de alta resolución desarrollada con fase móvil (1), derivatizada con p-anisaldehído sulfúrico, y observada a 366 nm. Las Imágenes fueron obtenidas bajo luz UV (365 nm) y cargadas a la plataforma *rTLC*, desde donde se obtuvo una matriz numérica de los datos correspondientes a la intensidad de los pixeles de cada banda presente en las placas. Un PCA de los datos obtenidos se realizó en el programa SIMCA®.

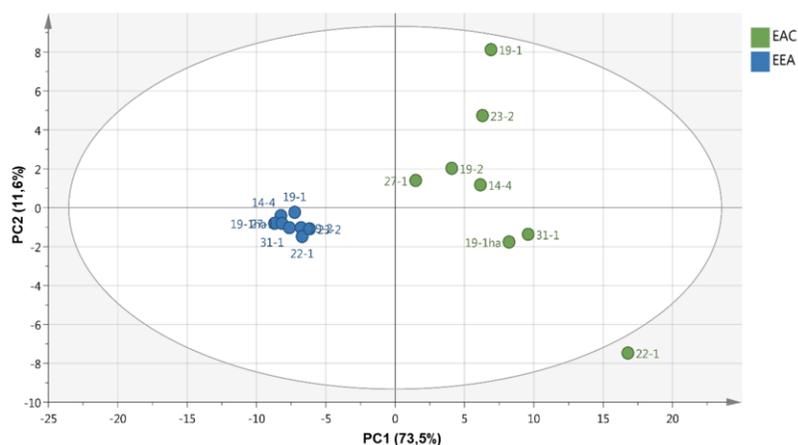


Figura 21. Análisis por PCA de los datos obtenidos a partir de la placa de CCF de alta resolución desarrollada con fase móvil (1), derivatizada con el reactivo NP, y observada a 366 nm. Imágenes fueron obtenidas bajo luz UV (365 nm) y cargadas a la plataforma *rTLC*, desde donde se obtuvo una matriz numérica de los datos correspondientes a la intensidad de los pixeles de cada banda presente en las placas. Un PCA de los datos obtenidos se realizó en el programa SIMCA®.

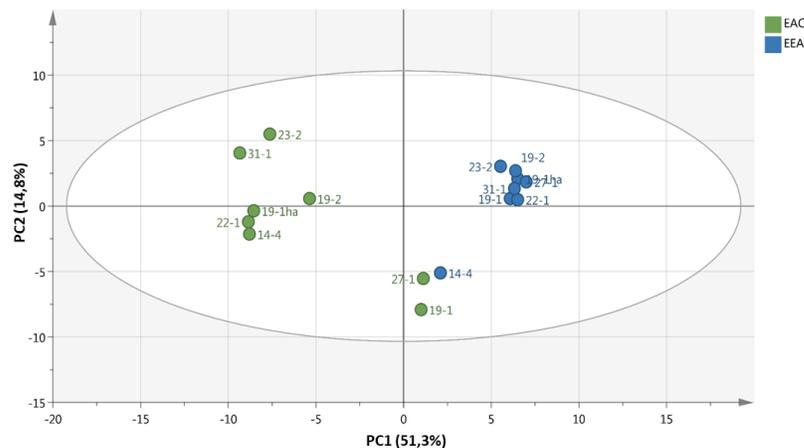


Figura 22. Análisis por PCA de los datos obtenidos a partir de la placa de CCF de alta resolución desarrollada con fase móvil (2), derivatizada con p-anisaldehído sulfúrico, y observada a 366 nm. Imágenes fueron obtenidas bajo luz UV (365 nm) y cargadas a la plataforma *rTLC*, desde donde se obtuvo una matriz numérica de los datos correspondientes a la intensidad de los píxeles de cada banda presente en las placas. Un PCA de los datos obtenidos se realizó en el programa SIMCA®.

En la **Figura 22** se puede observar el gráfico obtenido a partir del PCA de los datos obtenidos de la CCFAR desarrollada con la fase móvil 2 y derivatizada con pAS. En este análisis se puede observar que el PC1 representa un 51,3% de la variabilidad total de las muestras y el PC2 un 14,8%, lo que en total representa alrededor de un 66% de la variabilidad total (**Figura 22**). Al igual que lo expuestos en las **Figuras 21 y 22**, podemos observar la presencia de 2 grupos que se separan en el eje del PC1 donde los puntos verdes corresponden a los EACs y los puntos azules a los EEAs. Sin embargo, las muestras correspondientes a los EACs 27-1 y 19-1 y el EEA 14-4 se encuentran formando un tercer grupo, lo que podría significar que estos extractos poseen una composición química que es similar a pesar de las claras diferencias en términos de intensidad de las bandas observadas en la placa de CCFAR (**Figura 19**).

5. Análisis del perfil fenólico de los extractos mediante CLAE-DAD

Con la finalidad de continuar explorando la composición química de los EACs y EEAs, se realizó un análisis a través de la técnica de CLAE acoplada a DAD. El detector DAD nos permitió analizar las muestras en un rango de longitudes de onda entre 200 y 600 nm. Se obtuvieron y analizaron los cromatogramas a 280, 360 y 520 nm. A continuación, en la **Tabla 9** podemos observar el listado de patrones de compuestos fenólicos que se analizaron y en la **Figura 23** sus respectivos cromatogramas y espectros UV utilizados para determinar la presencia de éstos en los EACs y EEAs.

Compuesto	Tr (min)	λ Máx.(nm)
Ácido gálico	4,3	271,5
Ácido Cafeico	13,9	246,3 323,2
Rutina	20,9	256,7 354,1
Miricetina	26,2	253,7 371,0
Quercetina	31,5	255,4 370,9
Canferol	35,4	265,8 370,0

Tabla 9. Listado de patrones de compuestos fenólicos analizados por CLAE-DAD. El análisis de los patrones de referencia se realizó resuspendiéndolos en MeOH y preparando una mezcla que se inyectó en el equipo de CLAE-DAD. El análisis se realizó en un rango de longitudes de onda entre 200 y 600 nm. Se integraron los picos obtenidos y se analizaron sus tiempos de retención y máximos de absorbancia de luz UV. Tr = Tiempo de retención; λ Máx. = Máximos de absorbancia.

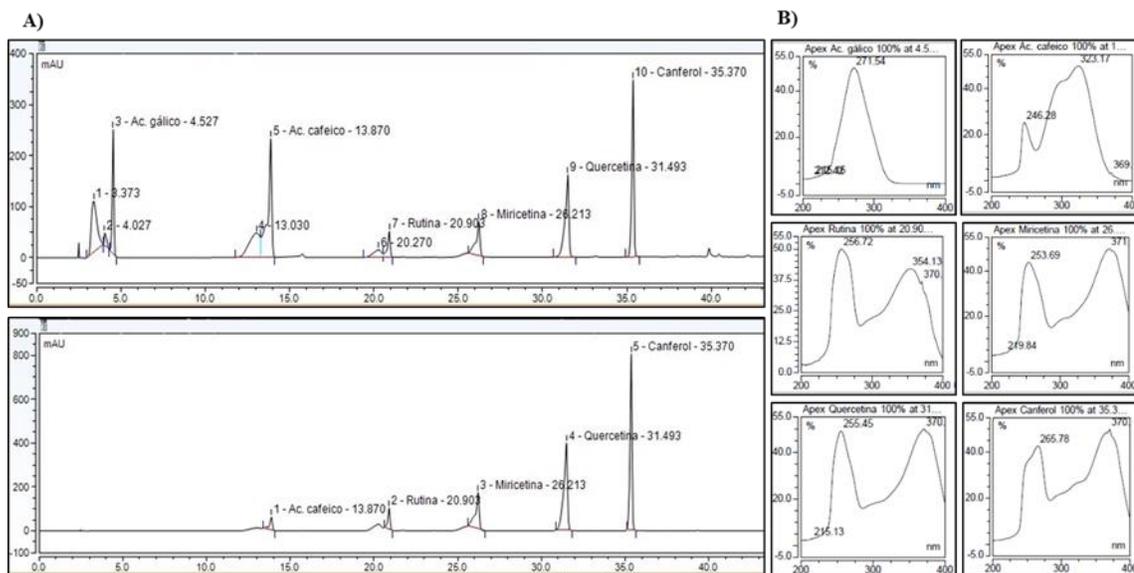


Figura 23. Cromatogramas obtenidos para la mezcla de patrones de referencia. Los patrones de referencia se resuspendieron en MeOH y se preparó una mezcla que se inyectó en el equipo de CLAE-DAD. El análisis se realizó en un rango de longitudes de onda entre 200 y 600 nm. Se integraron los picos obtenidos y se analizaron sus tiempos de retención y máximos de absorbancia de luz UV. **A)** Cromatogramas a 280 y 360 nm de patrones de compuestos polifenólicos analizados por CLAE-DAD. **B)** Espectros UV de los compuestos analizados por CLAE-DAD. T_r = Tiempo de retención; λ Máx. = Absorbancias máximas; Au = Unidades de absorbancia.

En la **Figura 23A** podemos observar los cromatogramas a 280 nm y 360 nm de los patrones de compuestos polifenólicos utilizados en este análisis. Además, podemos observar los máximos de absorbancia para cada uno de los picos analizados (**Figura 23B**). A 280 nm se observa la presencia de ácido gálico ($\lambda \sim 271$ nm), ácido cafeico ($\lambda \sim 246$ y 323 nm), rutina ($\lambda \sim 257$ y 354 nm), miricetina ($\lambda \sim 254$ y 371 nm), quercetina ($\lambda \sim 255$ y 371 nm) y canferol ($\lambda \sim 266$ y 370 nm), mientras que a 360 nm se observan todos menos el ácido gálico, ya que éste sólo posee un máximo de absorbancia alrededor de los 280 nm.

En la **Figuras 24 y 25** podemos observar el perfil de compuestos fenólicos del EAC 22-1 y del EEA 14-4, respectivamente, análisis que se llevó a cabo a 280, 360 y 520 nm. A 280 nm (**Figuras 24A y 25A**) y 360 nm (**Figuras 24B y 25B**) se puede apreciar la presencia de diversos picos cromatográficos que reflejan el perfil de compuestos

fenólicos presentes en los frutos de murtila. Estos picos cromatográficos se pueden observar claramente entre los 10 y 30 min de los cromatogramas obtenidos a 360 nm (**Figuras 24B y 25B**). Si bien el perfil de estos compuestos pareciera ser similar, si se pueden ver diferencias en la escala de absorbancia (eje Y) de los picos observados para los EACs y EEAs, ya que los picos en los EACs presentan valores de absorbancia alrededor de 3 veces mayores a los EEAs. Los EACs y EEAs de los demás genotipos estudiados presentan perfiles similares (**Anexo III**). A partir de la comparación entre los tiempos de retención y los espectros UV de los picos cromatográficos obtenidos para los extractos de los 8 genotipos de murtila analizados, se pudo establecer la presencia tentativa de algunos de los patrones señalados en la **Figura 23**, la que podría ser confirmada a través de la utilización de la espectrometría de masas. En las **Figuras 26 y 27** se puede observar la comparación de los cromatogramas a 280 y 360 nm del extracto EAC del G 27-1 con los patrones de compuestos polifenólicos y la identificación tentativa de aquellos compuestos.

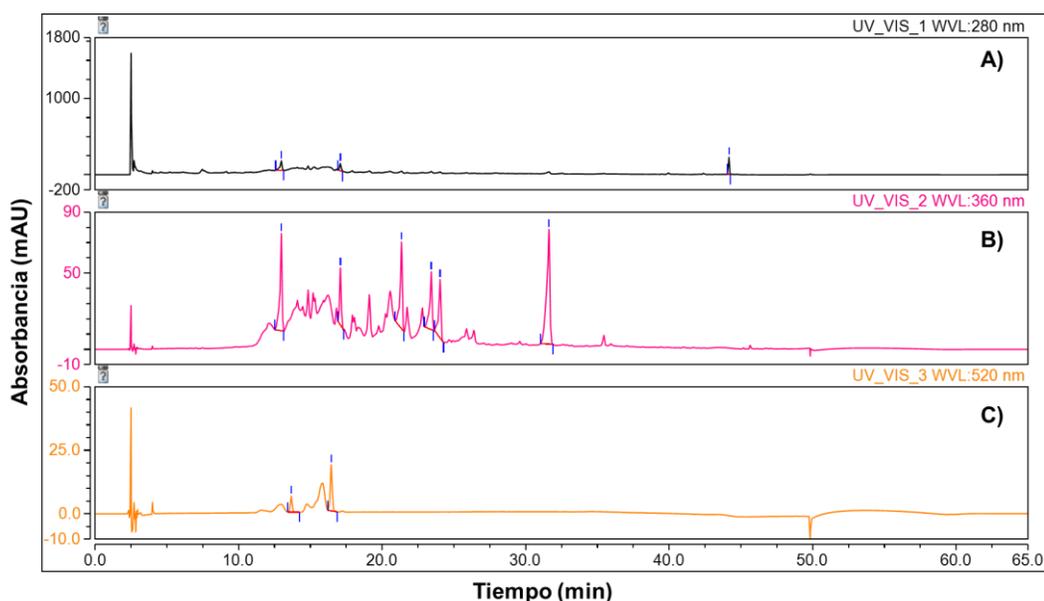


Figura 24. Cromatogramas obtenidos por CLAE-DAD para el EAC del genotipo 22-1. El análisis por CLAE-DAD se realizó en un rango de longitudes de onda entre 200 y 600 nm, inyectando las muestras resuspendidas en MeOH a una concentración de 7 mg/mL. Para el análisis se obtuvieron los cromatogramas a 280, 360 y 520 nm. **A)** Cromatograma a 280 nm del EEA 22-1 **B)** Cromatograma a 360 nm del EEA 22-1 **C)** Cromatograma a 520 nm del EEA 22-1. Donde, EAC = extracto obtenido con acetona; AU = unidades de absorbancia.

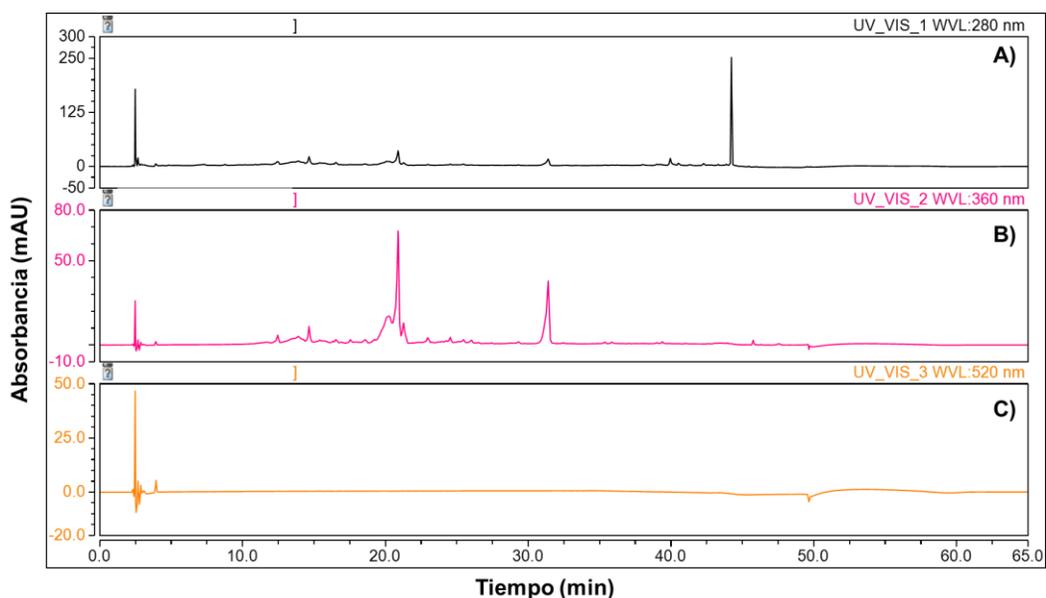


Figura 25. Cromatogramas obtenidos por CLAE-DAD para el EEA del genotipo 14-4. El análisis por CLAE-DAD se realizó en un rango de longitudes de onda entre 200 y 600 nm inyectando las muestras resuspendidas en MeOH a una concentración de 7 mg/mL. Para el análisis se obtuvieron los cromatogramas a 280, 360 y 520 nm. **A)** Cromatograma a 280 nm del EEA 14-4 **B)** Cromatograma a 360 nm del EEA 14-4 **C)** Cromatograma a 520 nm del EEA 14-4. Donde, EAC = extracto obtenido con acetona; AU = unidades de absorbancia.

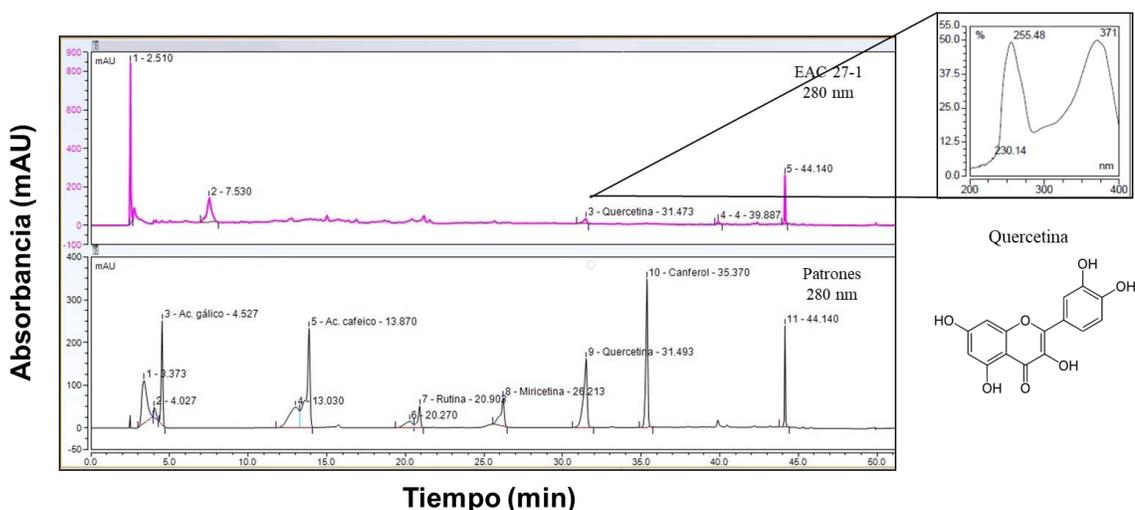


Figura 26. Identificación de quercetina a 280 nm en el EAC del genotipo 27-1 por CLAE-DAD. El análisis por CLAE-DAD se realizó en un rango de longitudes de onda entre 200 y 600 nm inyectando la muestra resuspendida en MeOH a una concentración de 7 mg/mL. Para el análisis, se obtuvieron los cromatogramas a 280, 360 y 520 nm. **Continúa en la pag. 57.**

Continuación Figura 26. La identificación tentativa de quercetina se llevó a cabo a través de la comparación de los Tr y máximos de absorbancia a 280 nm. Donde, AU = unidades de absorbancia; Tr = tiempo de retención.

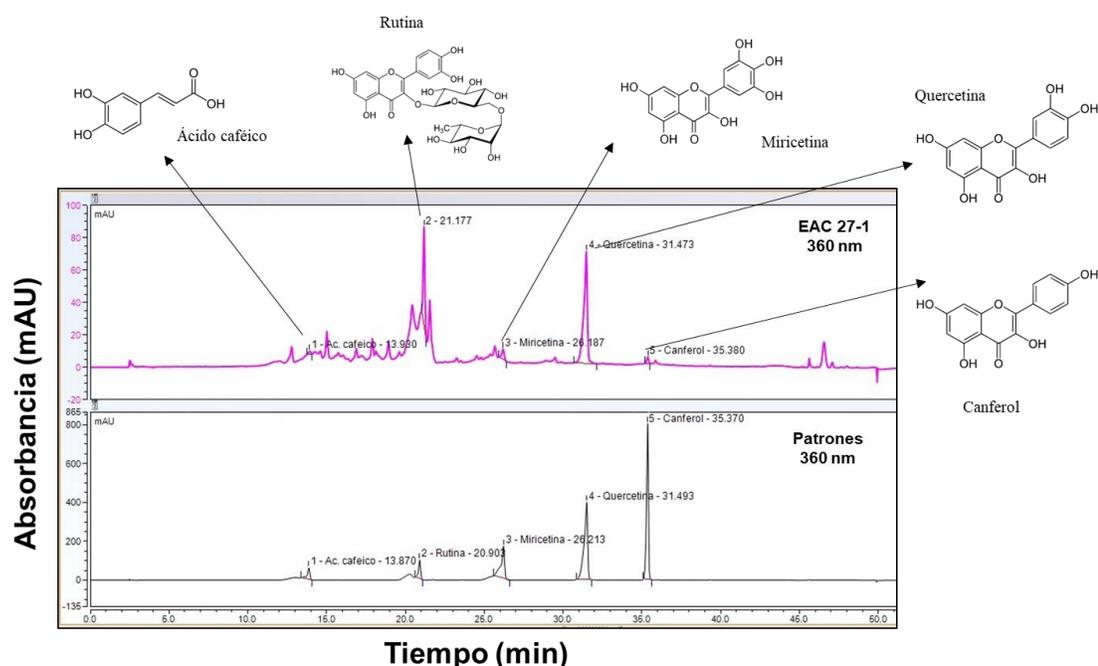


Figura 27. Identificación tentativa de ácido caféico, rutina, miricetina, quercetina y canferol a 360 nm en el extracto EAC del genotipo 27-1 por CLAE-DAD. El análisis por CLAE-DAD se realizó en un rango de longitudes de onda entre 200 y 600 nm inyectando la muestra resuspendida en MeOH a una concentración de 7 mg/mL. Para el análisis, se obtuvieron los cromatogramas a 280, 360 y 520 nm. La identificación tentativa de los compuestos se llevó a cabo a través de la comparación de los Tr y máximos de absorbancia a 360 nm. Donde, AU = unidades de absorbancia; Tr = tiempo de retención.

En las **Tablas 10 y 11** se resumen los resultados obtenidos a partir del análisis por CLAE-DAD para todos los extractos analizados. Como se puede observar, no se pudo determinar la presencia de ácido gálico en los extractos analizados (**Tabla 10 y 11**). La presencia de miricetina se descartó en los EACs 14-4, 27-1 y 31-1, y también en los EEAs 14-4, 19-1 y 27-1. Además, la presencia tentativa de canferol se pudo observar solo en los EACs y EEAs de los genotipos 19-1ha y 31-1, mientras que la presencia tentativa de ácido cafeico, rutina y quercetina se pudo observar en todos los extractos analizados.

Extracto	AG	AC	R	M	Q	C
EAC 14-4						
EAC 19-1						
EAC 19-1ha						
EAC 19-2						
EAC 22-1						
EAC 23-2						
EAC 27-1						
EAC 31-1						

Clave de colores
 N.A. Ausencia Presencia

Tabla 10. Identificación tentativa de compuestos polifenólicos en los EACs por CLAE-DAD.

La identificación tentativa de los compuestos se llevó a cabo a través de la comparación de los Tr y máximos de absorbancia. Donde, AG = ácido gálico; AC = ácido cafeico; R = rutina; M = miricetina; Q = quercetina; C = canferol.

Extracto	AG	AC	R	M	Q	C
EEA 14-4						
EEA 19-1						
EEA 19-1ha						
EEA 19-2						
EEA 22-1						
EEA 23-2						
EEA 27-1						
EEA 31-1						

Clave de colores
 N.A. Ausencia Presencia

Tabla 11. Identificación tentativa de compuestos polifenólicos en los EEAs por CLAE-DAD.

La identificación tentativa de los compuestos se llevó a cabo a través de la comparación de los Tr y máximos de absorbancia. Donde, AG = ácido gálico; AC = ácido cafeico; R = rutina; M = miricetina; Q = quercetina; C = canferol.

La presencia de antocianinas se monitoreó a una longitud de onda de 520 nm (**Figuras 24C y 25C**) (Brito, Areche, Sepulveda, Kennelly, & Simirgiotis, 2014; Durst & Wrolstad, 2001; Li, Meng, & Li, 2016). Como se puede observar en las **Figuras 24C y 25C**, el EAC del genotipo 22-1 y el EEA del genotipo 14-4 presentan menos picos cromatográficos a 520 nm en comparación a los cromatogramas obtenidos a 280 y 360 nm, lo que representa que en estos extractos hay una menor presencia de antocianinas. Perfiles similares se pueden observar en los cromatogramas de los demás genotipos analizados (**Anexo III**).

En conjunto, los resultados obtenidos a partir del análisis de fenoles totales por FC (**Figuras 10, 11 y 12**), CCF (**Figuras 14, 15 y 16**), CCFAR (**Figuras 18, 19, 20**), y CLAE-DAD (**Tablas 10 y 11**), nos permitieron dar cuenta del perfil de compuestos presentes en las muestras estudiadas, donde podemos observar que los EACs y EEAs de frutos de murtila presentan una gran cantidad de compuestos fenólicos, entre los que destacaron los flavonoles y sus derivados glicosilados. Sin embargo, se pudo observar que el perfil de compuestos polifenólicos presentes en los extractos de frutos de distintos genotipos de murtila es más bien similar. Por otro lado, se observaron diferencias en la composición de antocianinas y de triterpenos de los extractos analizados, compuestos que están presentes principalmente en los EACs.

A continuación, se presentarán los resultados correspondientes al análisis del efecto de los extractos obtenidos a partir de los frutos de distintos genotipos de murtila sobre la agregación proteica en un modelo celular de agregación de poliglutaminas, con la finalidad de correlacionar las diferencias en la composición química de los extractos con posibles variaciones en sus efectos farmacológicos.

6. Estudios Celulares

6.1 Análisis de la agregación proteica en un modelo de agregación de poliglutamina

Para poder llevar a cabo el análisis del efecto de los extractos de murtila sobre la agregación proteica, se implementó un modelo celular de sobreexpresión transiente de un péptido compuesto por repeticiones de glutamina que se caracteriza por agregarse y formar inclusiones intracelulares (Vidal, Figueroa, Court, Thielen, Molina, Wirth, Caballero, Kiffin, Segura-Aguilar, Cuervo, Glimcher, & Hetz, 2012). Para llevar a cabo esto, se transfectaron las células HEK293 con distintas cantidades del plásmido que expresa un péptido con 79 repeticiones de glutamina fusionado a EGFP (polyQ₇₉-EGFP) para, luego de 24 y 48 h, determinar la formación de inclusiones positivas para EGFP (EGFP (+)), las cuales se observaron como puntos de fluorescencia verde en el equipo *Arrayscan XTI* de *cellomics* utilizando la aplicación *Spot detector*. Con los datos obtenidos, fue posible calcular el factor Z'.

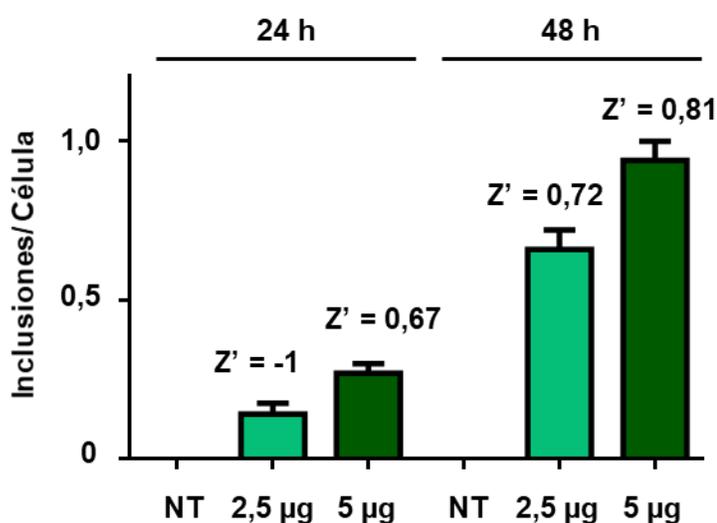


Figura 28. Análisis de la formación de inclusiones de polyQ₇₉-EGFP en células HEK293. Las células HEK293 fueron transfectadas con 2,5 y 5,0 ug del plasmidio de polyQ₇₉-EGFP y se cuantificó el número de inclusiones por células EGFP (+) y se calculó de factor Z'. Las células HEK293 se transfectaron usando el reactivo PEI. Luego de 24 y 48 h de transfección, se analizaron las células utilizando el equipo *cellomics* y la aplicación *Spot detector*. El cálculo del factor Z' se realizó utilizando los datos del número de inclusiones/célula. NT = no transfectado.

Como se puede apreciar en la **Figura 28**, a las 24 h post-transfección y utilizando 2,5 µg del plasmidio polyQ₇₉-EGFP, el número de inclusiones EGFP(+) por célula transfectada es alrededor de 0,10. Esto quiere decir que cerca del 10% de las células transfectadas presentan inclusiones de polyQ₇₉-EGFP, y el factor Z' presenta un valor de -1,00. A las 48 h post transfección, se observa un aumento en el número de inclusiones EGFP(+) por célula transfectada (0,60 inclusiones/célula) y el factor Z' es 0,72. En el caso de las células transfectadas con 5 µg de polyQ₇₉-EGFP, a las 24h post-transfección alrededor del 30% de las células transfectadas presentan agregados proteicos (Z'=0,67), valor que se acerca a 1,00 inclusión por célula transfectada a las 48 h luego de la transfección (Z'=0,81).

Por lo tanto, para los siguientes análisis se trabajó con 5 µg de polyQ₇₉-EGFP. Posteriormente se evaluó la reproducibilidad del modelo de transfección transiente, evaluando tanto el número de inclusiones de polyQ₇₉-EGFP formadas, como el factor Z' en 3 experimentos independientes. En la **Figura 29** se presenta el promedio de los resultados de los experimentos realizados. La formación de las inclusiones de polyQ₇₉-EGFP se puede observar en la **Figura 29A**. Los núcleos fueron marcados con el reactivo Hoescht 33342 (azul) y en las imágenes se pueden observar las inclusiones de polyQ₇₉-EGFP que se presentan principalmente como inclusiones intranucleares (**Figura 29A**). Las imágenes obtenidas en el equipo *cellomics* fueron analizadas con la aplicación *spot detector* del software de análisis integrado en la plataforma, obteniendo el número de inclusiones EGFP (+) por célula transfectada luego de 24 y 48 h de transfección. Los datos obtenidos fueron exportados a una planilla Excel para realizarlos análisis posteriores. Como se puede observar en la **Figura 29B**, se observaron diferencias significativas entre el número de inclusiones por célula 24 h post transfección ($0,30 \pm 0,02$) y el número de inclusiones por célula 48 h post transfección ($0,83 \pm 0,09$). Por otro lado, no se observaron diferencias significativas ($p < 0,05$) entre el promedio del factor Z' a las 24 horas ($0,69 \pm 0,04$) y el valor obtenido a las 48 horas post transfección ($0,85 \pm 0,04$) (**Figura 29C**). Estos resultados nos indican que el modelo puede ser utilizado para llevar a cabo el análisis del efecto de los extractos sobre la agregación de polyQ₇₉-EGFP. Previo a este análisis, se determinaron los rangos de concentraciones no tóxicas de cada extracto en células HEK293, resultados que se muestran a continuación.

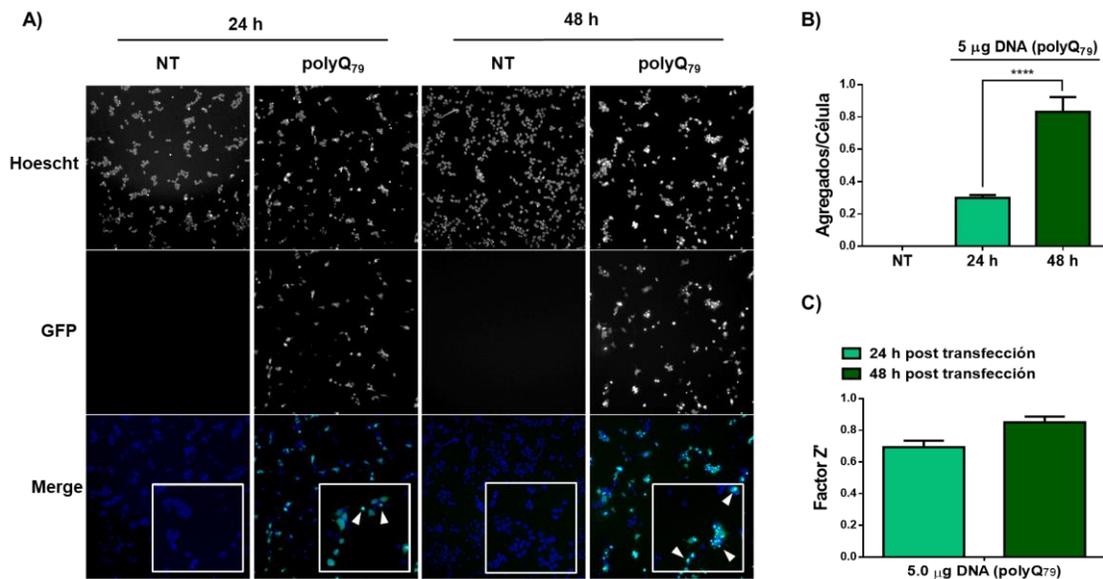


Figura 29. Análisis de la reproducibilidad del modelo de transfección transitoria para análisis de la agregación de polyQ₇₉-EGFP en la plataforma *cellomics*. El cálculo del factor Z' se realizó utilizando los datos del número de agregados/célula. **A)** Las células HEK293 se transfectaron usando el reactivo PEI y luego de 24 y 48 h post transfección se registraron imágenes de las células utilizando el equipo *ArraysScan XTI* y la aplicación *Spot detector* para detectar las inclusiones EGFP (+). Los núcleos fueron marcados con Hoescht 33342 previo al análisis. **B)** Promedio del número de agregados por célula transfectada. **C)** Análisis del Factor Z' a las 24 y 48 h post transfección. Resultados son el promedio de 3 experimentos independientes (n=3). Las diferencias estadísticamente significativas fueron obtenidas realizando test t (****: p < 0,0001). NT = no transfectado.

6.2 Análisis de la toxicidad de los EACs y EEAs de frutos de distintos genotipos de murtila en células HEK293

Previo al análisis del efecto de los extractos sobre la agregación de polyQ₇₉-EGFP, se evaluó la toxicidad de los distintos extractos sobre las células utilizando las tinciones Hoechst 33342 y 7AAD en células HEK293. Se analizaron 5 concentraciones para cada extracto: 0,25; 2,5; 25; 50; 100 µg/mL y se utilizó DMSO al 10% como control de toxicidad. Como se puede apreciar en la **Figura 30**, luego de 24 horas de tratamiento con los EACs la toxicidad celular es concentración dependiente, donde en la mayor concentración analizada (100 µg/mL) podemos observar la muerte de casi el 100% de las células con los EACs de los Gs 19-1, 19-1ha, 19-2, y 23-2. Sin embargo, los EACs

de los genotipos 14-4, 22-1 y 27-1 fueron la excepción, donde la toxicidad a la mayor concentración no supera el 25 %, siendo el EAC 14-4 el menos tóxico entre los EACs analizados. En el caso de los EEAs, ninguno de los extractos a las diferentes concentraciones analizadas tuvo una toxicidad superior al 5% (**Figura 30**). Además, no hubo relación entre el CFT de los EACs y EEAs y la toxicidad a la mayor concentración analizada (**Figura 31**).

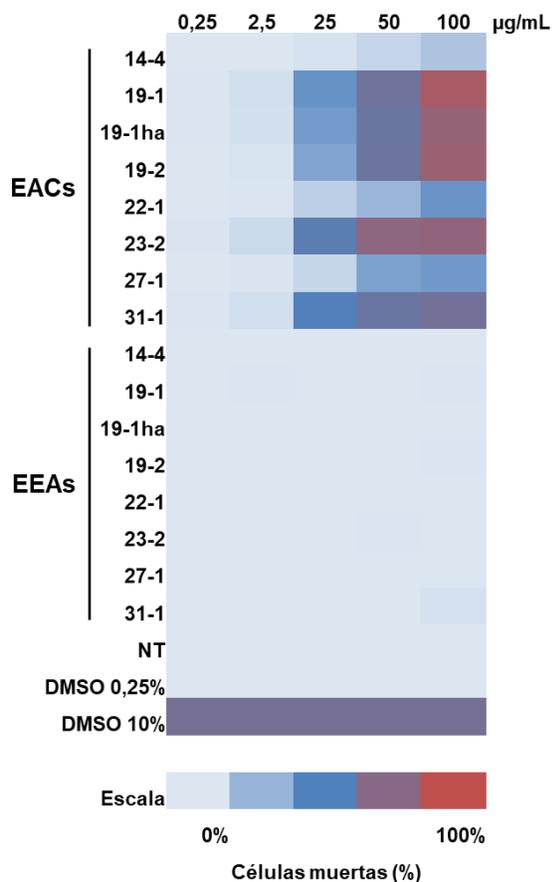


Figura 30. Análisis de la toxicidad celular de los EAC y EEA de frutos de distintos genotipos de murtilla sobre células HEK293. Las células HEK293 se sembraron en placas de 96 pocillos y luego de 24 h fueron tratadas con los EACs y EEAs en un rango de concentración entre 0,25 y 100 µg/mL. Luego de 24 h de tratamiento, las células fueron marcadas con el reactivo Hoescht 33342 para el reconocimiento de los núcleos y el reactivo 7-AAD para el reconocimiento de células muertas utilizando la plataforma *Arrayscan XTI*. Con los datos obtenidos se calculó el porcentaje de células muertas en cada una de las condiciones. Los resultados corresponden al promedio de 3 experimentos independientes. NT = no tratado, DMSO = dimetilsulfóxido, EAC= extracto de acetona, EEA = extracto de etanol acidificado.

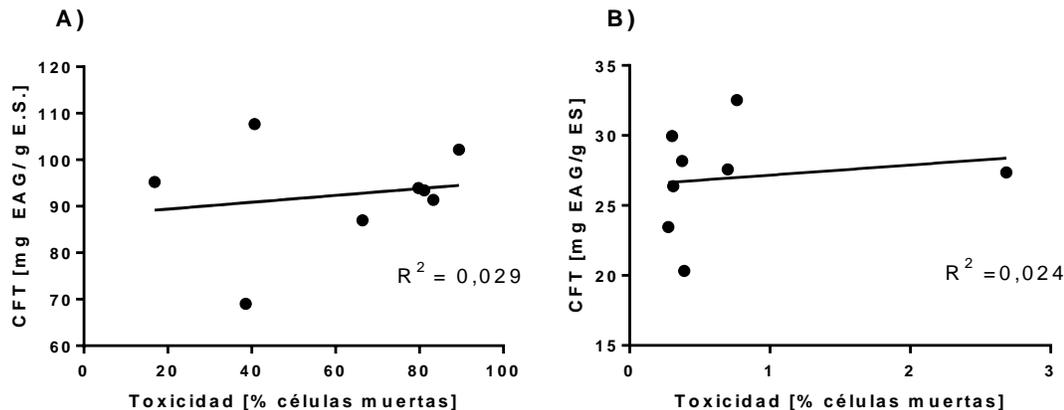


Figura 31. Relación entre la toxicidad celular y el CFT de los EACs y EEAs de frutos de distintos genotipos de murtila. La correlación entre el CFT y la toxicidad de los EACs **(A)** y EEAs **(B)** se realizó considerando el porcentaje de células muertas a la mayor concentración analizada. El parámetro estadístico utilizado fue el R^2 (correlación lineal de Pearson). CFT = contenido de fenoles totales; EAG = equivalentes de ácido gálico; EAC = extractos obtenidos con acetona; EEA = extracto de etanol acidificado.

Como se puede observar en la **Figura 31A**, la correlación entre el CFT de los EACs y su toxicidad celular no supera el 3% ($R^2 = 0,029$), ocurriendo lo mismo en el caso de los EEAs ($R^2 = 0,024$) (**Figura 31B**). Considerando estos resultados, se decidió que para el análisis de la capacidad de los extractos de reducir el número de agregados proteicos de polyQ₇₉-EGFP se trabajaría en un rango de concentraciones entre 3,1 a 25,0 µg/mL para los EACs, excepto para el EAC 14-4, que se utilizó en un rango entre 12,5 a 100,0 µg/mL debido a su menor toxicidad. En el caso de los EEAs, debido a su baja toxicidad, se trabajó en un rango de concentraciones entre 12,5 a 100 µg/mL.

6.3 Análisis del efecto de los EACs y EEAs de frutos de distintos genotipos de murtila sobre el número de inclusiones de polyQ₇₉-EGFP

Se evaluó el efecto de los EAC y EEA de frutos de distintos genotipos de murtila sobre número de inclusiones de polyQ₇₉-EGFP a las 24 y 48 h post tratamiento. En las siguientes figuras se resumen los resultados obtenidos.

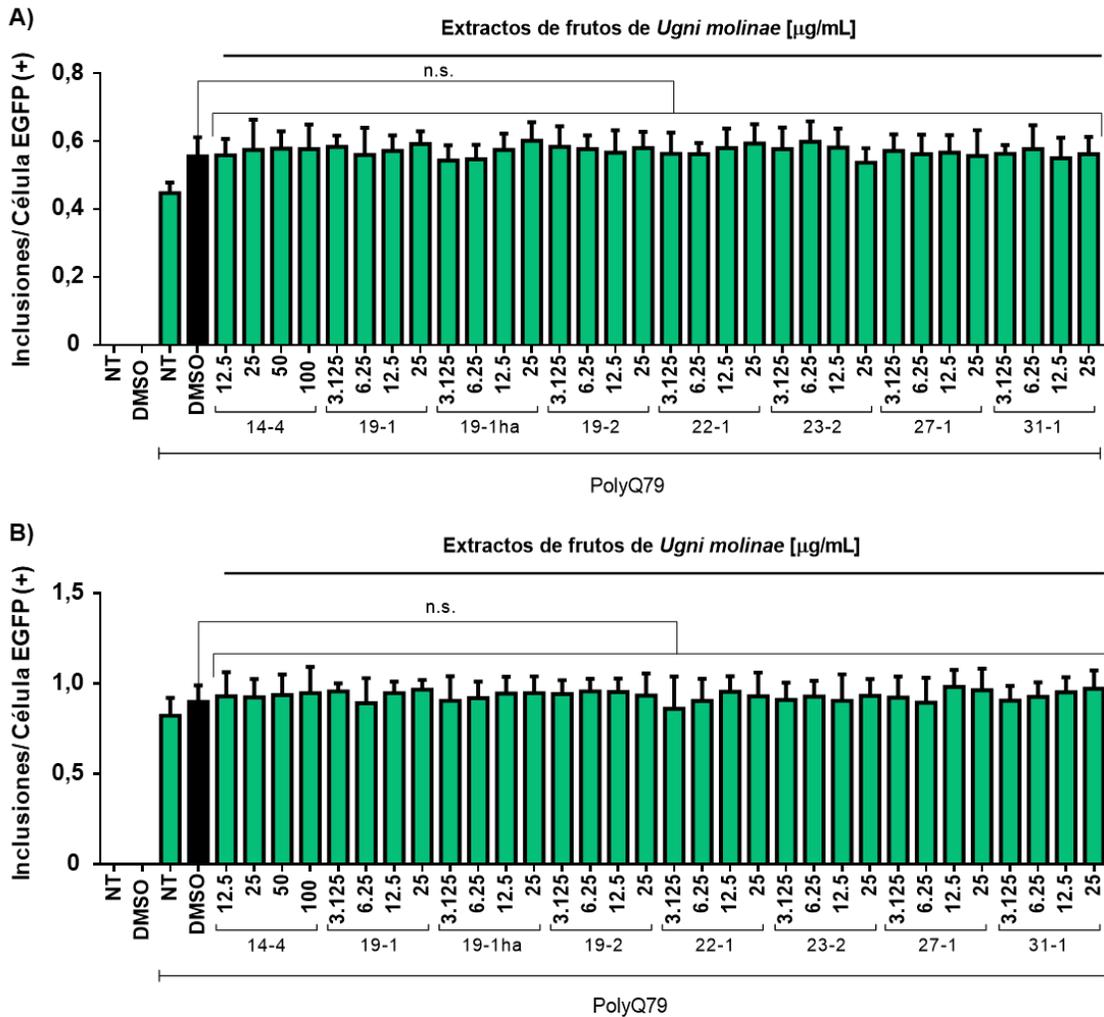


Figura 32. Efecto de los EACs sobre el número de inclusiones de polyQ₇₉-EGFP en células HEK293. Las células HEK293 transfectadas y sembradas en placas de 96 pocillos fueron tratadas con los EACs en un rango de concentraciones entre 3,1 a 12,5 $\mu\text{g/mL}$, excepto para el EAC 14-4 donde se analizaron concentraciones entre 12,5 a 100 $\mu\text{g/mL}$. El número de inclusiones por célula EGFP (+) se analizó en el equipo *Arrayscan XTI* luego de 24 **(A)** y 48 h **(B)** de tratamiento utilizando la aplicación *Spot detector*. Los resultados corresponden al promedio de 3 experimentos independientes. NT = no tratado; DMSO: dimetilsulfóxido; n.s = no significativo ($p > 0,05$).

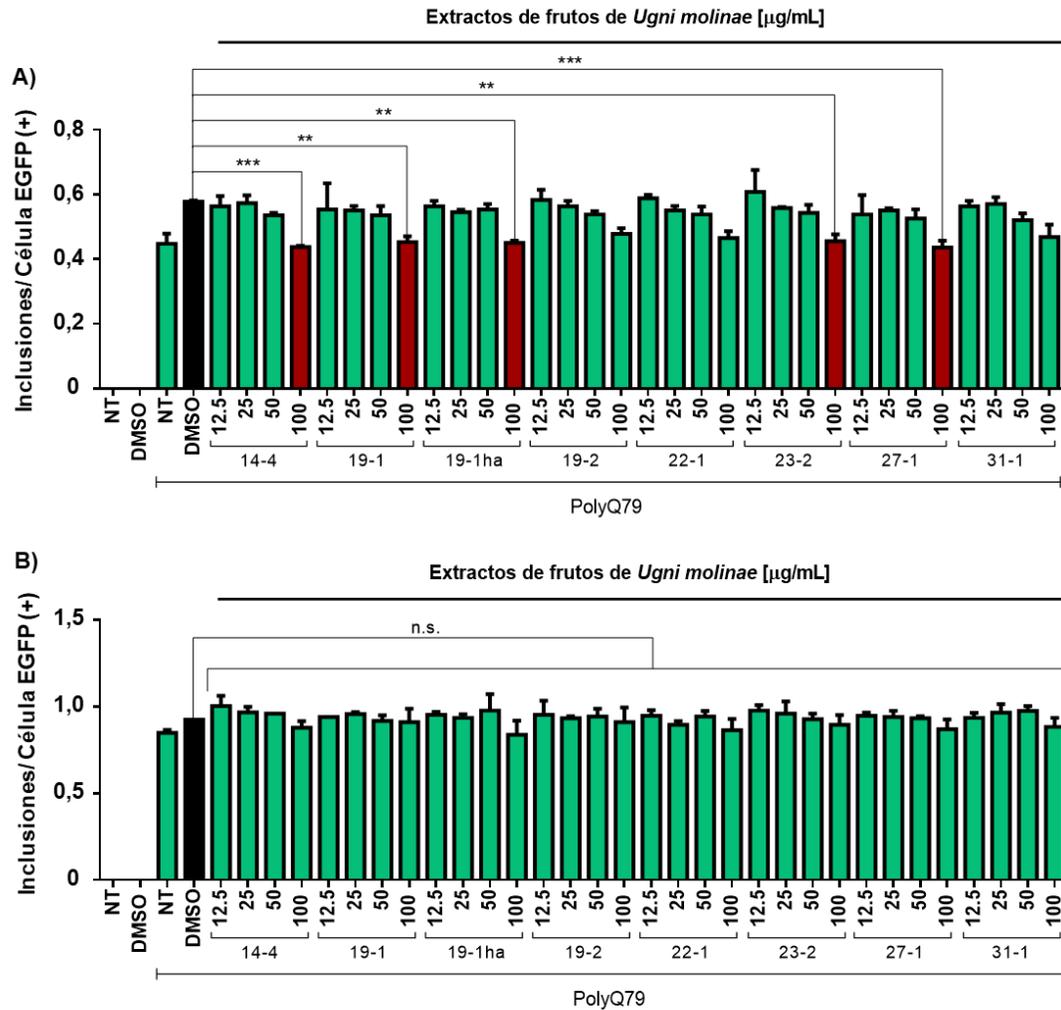


Figura 33. Efecto de los EEAs sobre el número de inclusiones de polyQ₇₉-EGFP en células HEK293. Las células HEK293 transfectadas y sembradas en placas de 96 pocillos fueron tratadas con los EEAs en un rango de concentraciones entre 12,5 a 100 $\mu\text{g/mL}$. El número de inclusiones por célula EGFP (+) se analizó en el equipo *ArraysScan XTI* luego de 24 **(A)** y 48 h **(B)** de tratamiento utilizando la aplicación *Spot detector*. Los resultados corresponden al promedio de 3 experimentos independientes. ** y *** representan resultados estadísticamente significativos ($p < 0,01$ y $p < 0,001$ respectivamente) con respecto al control. NT = no tratado; DMSO: dimetilsulfóxido.

En las **Figuras 32 y 33** se exponen los resultados obtenidos luego de 24 h y 48 h de tratamiento con los EACs (**Figura 32**) y EEAs (**Figura 33**) obtenidos a partir de los frutos de murtila. El tratamiento con los EACs no tuvo efectos sobre el número de inclusiones de polyQ₇₉-EGFP a ninguno de los tiempos y concentraciones analizados (**Figura 32**).

Por otro lado, y a pesar de que el perfil de compuestos fenólicos de los EACs y EEAs es similar, se observó un efecto significativo en la disminución del número de inclusiones de polyQ₇₉-EGFP con 5 de los EEAs a una concentración de 100 µg/mL (destacados en rojo) luego de 24 h de tratamiento (EEA 14-4, EEA 19-1, EEA 19-1 ha, EEA 23-2, EEA 27-1) (**Figura 33A**). Sin embargo, este efecto no se observa luego de 48 h de tratamiento (**Figura 33B**). El extracto que produjo una mayor disminución en el número de inclusiones fue el EEA 27-1, con alrededor de un 24,3 % de disminución de las inclusiones, seguido del EEA 14-4 (23,9 % de disminución), el EEA 19-1ha (21,7 % de disminución), el EEA 19-1 (21,3 % de disminución) y del EEA 23-2 (20,9 % de disminución). Cabe destacar que el tratamiento con los EEAs no afecta directamente la expresión del péptido polyQ₇₉-EGFP luego de 24 h de tratamiento en las células transfectadas, de acuerdo con lo observado en los experimentos llevados a cabo en la plataforma *Arrayscan XTI* de *cellomics* (**Figura 34**).

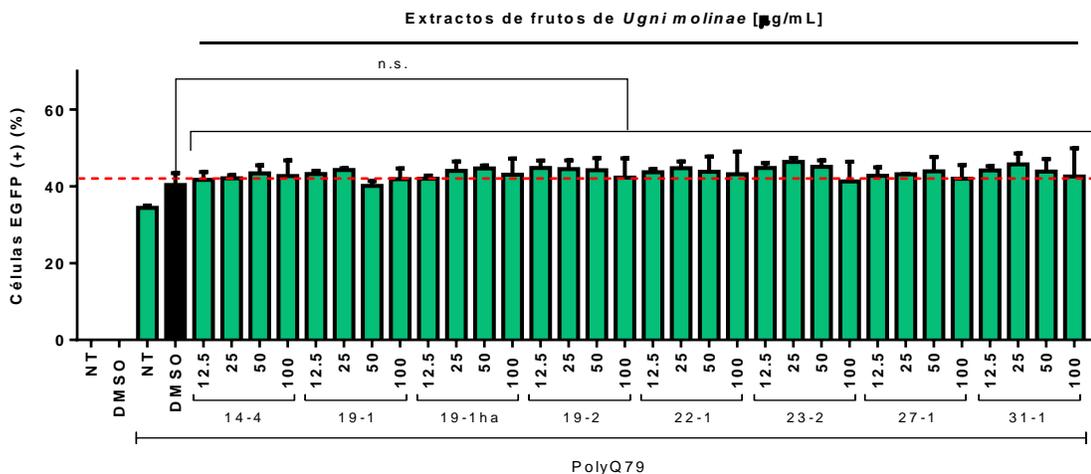


Figura 34. Expresión del péptido de polyQ₇₉-EGFP en células HEK293 luego de 24 horas de tratamiento con los EEAs. Las células HEK293 transfectadas y sembradas en placas de 96 pocillos fueron tratadas con los EEAs en un rango de concentraciones entre 12,5 a 100 µg/mL. El número de células EGFP (+) se analizó en el equipo *Arrayscan XTI* luego de 24 h de tratamiento utilizando la aplicación *Spot detector*. NT = no tratado; GFP = proteína fluorescente verde (del inglés *green fluorescent protein*); DMSO = dimetilsulfoxido; EEA = extracto obtenido con etanol acidificado.

De acuerdo con los resultados obtenidos, los EEAs de los genotipos 14-4, 19-1, 19-1ha, 23-2 y, 27-1 fueron seleccionados para análisis posteriores cuya finalidad fue la de

validar su capacidad de disminuir el número de inclusiones de polyQ₇₉-EGFP a través de la técnica de *Western Blot*.

6.4 Validación del efecto de los extractos seleccionados sobre la agregación proteica

Con la finalidad de validar los resultados obtenidos en los experimentos realizados en la plataforma *Arraysan XTI* de *cellomics*, se analizó el efecto del tratamiento con los extractos seleccionados sobre los niveles de especies de alto peso molecular (EAPM) del péptido polyQ₇₉-EGFP y, además un fragmento patogénico de la HTT (mHTT_{Q85}-GFP) en células HEK293 a través de la técnica de *Western blot* de acuerdo con los protocolos señalados en la sección de materiales y métodos (Sección V - 2.7.6). También se analizaron los efectos de los extractos en la expresión del péptido control polyQ₁₁-EGFP, el cual se caracteriza por no formar inclusiones intracelulares. Para este análisis se realizaron tratamientos con los ESel por 16 h a una concentración de 100 µg/mL.

En la **Figura 35** se pueden observar los resultados obtenidos en el análisis de los efectos de los extractos seleccionados sobre la agregación de polyQ₇₉-EGFP. En la **Figura 35B** se puede observar una disminución significativa ($p < 0,01$), cercana al 50% de los niveles de las EAPM de polyQ₇₉-EGFP después de 16 h de tratamiento con el EEA 19-1, mientras que no se observa el mismo efecto luego del tratamiento con los otros extractos seleccionados, donde se puede observar que no tienen un efecto significativo sobre los niveles de las EAPM de polyQ₇₉-EGFP (**Figura 35A y B**). Además, también se observa una disminución significativa ($p < 0,05$) en los niveles del monómero del péptido polyQ₇₉-EGFP luego del tratamiento con el EEA 19-1 (**Figura 35C**). Esta disminución en los niveles del monómero del péptido polyQ₇₉-EGFP es similar a la disminución observada en los niveles de las EAPM, acercándose a un 50% de disminución respecto al control. De igual manera, no se observan efectos significativos sobre los niveles del monómero de péptido polyQ₇₉-EGFP luego del tratamiento con los otros extractos seleccionados, e incluso, se puede observar un leve aumento en los niveles del monómero luego del tratamiento con los EEAs 14-4 y 27-1.

Para complementar los resultados obtenidos respecto del efecto del tratamiento con los ESel sobre los agregados del péptido de polyQ₇₉-EGFP, se realizó el análisis del efecto que pudiera tener el tratamiento con estos extractos sobre los niveles de las EAPM de

un fragmento de la proteína huntingtina mutante con 85 repeticiones de glutamina, utilizado para modelar *in vitro* la enfermedad de Huntington. Luego estas células fueron tratadas por 16 h con los ESeI a una concentración de 100 µg/mL. Los resultados obtenidos se muestran en la **Figura 36**.

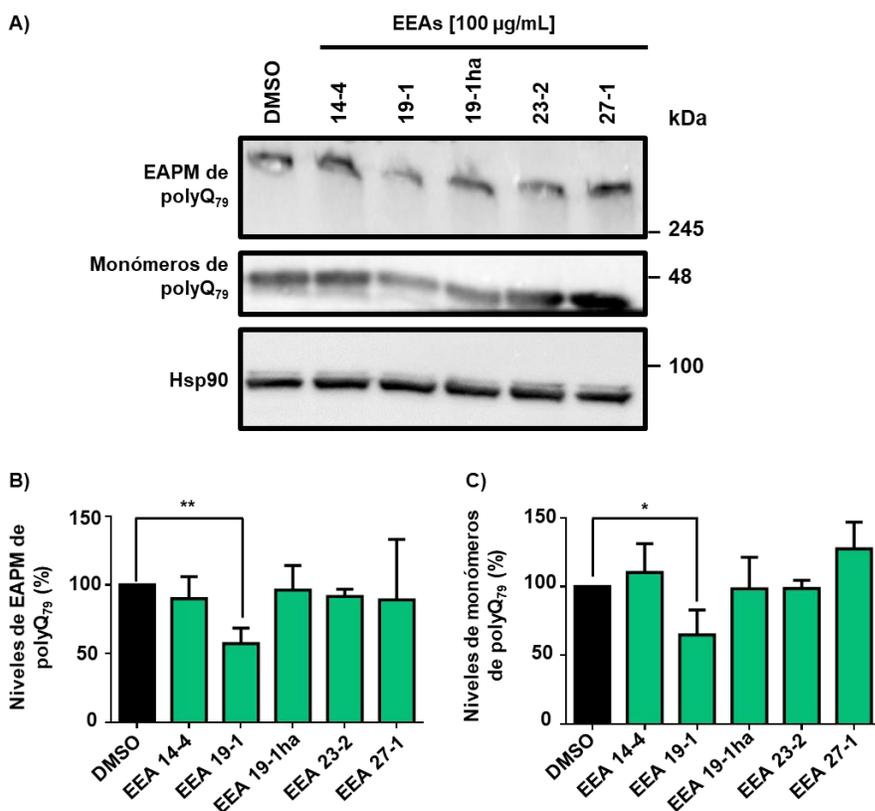


Figura 35. Efecto de los extractos seleccionados sobre los niveles de las EAPM de polyQ₇₉-EGFP. **A)** Se analizó el efecto de los extractos seleccionados sobre los niveles de EAPM de polyQ₇₉-EGFP por *Western blot*. Las células HEK293 fueron transfectadas con el plasmidio que codifica para el péptido polyQ₇₉-EGFP y luego de 4 h se realizó el tratamiento con los ESeI a una concentración de 100 µg/mL. Luego de 16 h de tratamiento, se recolectaron y homogeneizaron las células. Los niveles de las EAPM y los monómeros de polyQ₇₉-EGFP se analizaron a través de la técnica de western blot utilizando un anticuerpo anti-GFP. La expresión de HSP90 se monitoreó como control de carga **B)** Cuantificación de los niveles de las EAPM de polyQ₇₉-EGFP. Los resultados se expresaron como porcentaje respecto del control **C)** Cuantificación de los niveles del monómero del péptido polyQ₇₉-EGFP. Los resultados se expresaron como porcentaje respecto del control (DMSO). Resultados corresponden al promedio de 3 experimentos independientes. El análisis estadístico se realizó a través de la prueba ANOVA de 2 vías y el test de comparaciones múltiples de Bonferroni (** = p < 0,01 y * = p < 0,05). EAPM: especies de alto peso molecular; DMSO: dimetilsulfóxido.

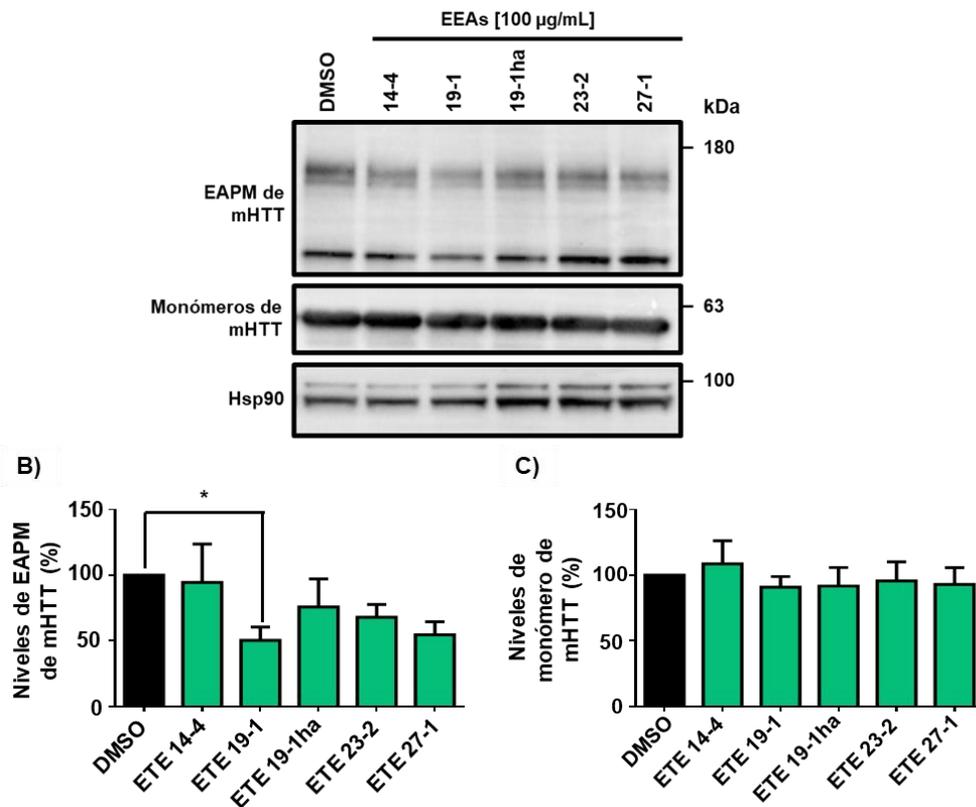


Figura 36. Efecto de los extractos seleccionados sobre los niveles de las EAPM de mHTT_{Q85}-GFP. **A)** Se analizó el efecto de los extractos seleccionados sobre los niveles de las EAPM de mHTT_{Q85}-GFP por *Western blot*. Las células fueron transfectadas con el plasmidio que codifica para los primeros 171 amino ácidos del exón 1 de la proteína HTT con una extensión de 85 glutaminas y fusionada a GFP (mHTT_{Q85}-GFP). Los niveles de las EAPM y los monómeros de mHTT_{Q85}-GFP se analizaron a través de la técnica de western blot utilizando un anticuerpo anti-GFP. La expresión de HSP90 se monitoreó como control de carga **B)** Cuantificación de los niveles de las EAPM de mHTT_{Q85}-GFP. Los resultados se expresaron como porcentaje respecto del control (DMSO). **C)** Cuantificación de los niveles de monómeros de mHTT_{Q85}-GFP. Los resultados se expresaron como porcentaje respecto del control (DMSO). Los Resultados corresponden al promedio de 3 experimentos independientes. El análisis estadístico se realizó a través de la prueba ANOVA de 2 vías y el test de comparaciones múltiples de Bonferroni (* = $p < 0,05$). DMSO: dimetilsulfóxido; EAPM = especies de alto peso molecular.

Como podemos observar en la **Figura 36**, luego del tratamiento por 16 h con los EET de los genotipos 19-1, 23-2, y 27-1, hay una tendencia a la disminución en los niveles de las EAPM de mHTT_{Q85}-GFP. Sin embargo, solo el EEA 19-1 presentó un efecto significativo ($p < 0,05$) sobre los niveles de EAPM con respecto al control (DMSO)

(Figura 36A y B). El EEA 19-1 redujo los niveles de las EAPM de mHTT_{Q85}-GFP en alrededor de un 50%, mientras que el EEA 27-1 lo hizo en alrededor de un 45% y el EEA 23-2 en un 30% **(Figura 36B)**. Además, ninguno de los extractos provocó cambios significativos en los niveles del monómero de mHTT_{Q85}-GFP, lo que indicaría que los efectos observados no son a nivel de la expresión de esta proteína, sino que actuarían inhibiendo y/o desagregando a las especies oligoméricas **(Figura 36C)**.

Como control de los efectos del tratamiento con los extractos seleccionados sobre la expresión de proteínas, también se analizó el efecto que pudiera tener el tratamiento con estos extractos sobre los niveles del péptido control polyQ₁₁-EGFP. Como podemos observar en la **Figura 37**, luego de 16 h de tratamiento con los extractos seleccionados, no hubo cambios significativos en los niveles del péptido polyQ₁₁-EGFP **(Figura 37A y B)**.

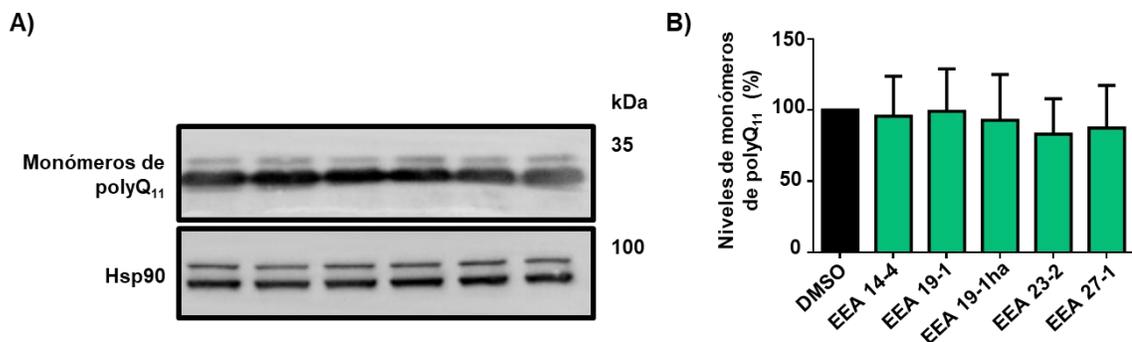


Figura 37. Efecto de los extractos seleccionados sobre los niveles de polyQ₁₁-EGFP. **A)** Se analizó el efecto de los ESEl sobre los niveles de polyQ₁₁-EGFP por *Western blot*. Las células fueron transfectadas con el plasmidio que expresa polyQ₁₁-EGFP y luego de 4 h se realizó el tratamiento con los ESEl a una concentración de 100 µg/mL. Los niveles de los monómeros de polyQ₁₁-EGFP se analizaron a través de la técnica de western blot utilizando un anticuerpo anti-GFP. La expresión de HSP90 se monitoreó como control de carga **B)** Cuantificación de los niveles de polyQ₁₁-EGFP. Los resultados se expresaron como porcentaje respecto del control (DMSO). Los resultados corresponden al promedio de 3 experimentos independientes. El análisis estadístico se realizó a través de la prueba ANOVA de 2 vías y el test de comparaciones múltiples de Bonferroni ($p > 0,05$). DMSO: dimetilsulfóxido.

En resumen, solo después del tratamiento con el EEA 19-1 se observó una disminución significativa en las EAPM de polyQ₇₉-EGFP. Los demás extractos no tuvieron un efecto significativo sobre la agregación de este péptido. También se determinó una disminución

significativa en los niveles del monómero de polyQ₇₉-EGFP con el EEA 19-1. Por otro lado, luego del tratamiento con los EEAs de los genotipos 19-1, 27-1 y 23-2 no se observaron cambios en los niveles del monómero de mHTT_{Q85}-GFP pero si una disminución de los niveles de las EAPM de mHTT_{Q85}-GFP que fue significativa sólo después del tratamiento con el EEA 19-1 (**Figura 36**). Finalmente, ninguno de los extractos tuvo efecto sobre los niveles del péptido control polyQ₁₁-EGFP (**Figura 37**).

Con la finalidad de dar cuenta de los compuestos químicos presentes en los extractos seleccionados que pudieran ser responsables de los efectos observados sobre los agregados de polyQ₇₉-EGFP y mHTT_{Q85}-GFP, se realizó un análisis por CLAE-ESI-EM/EM.

7. Análisis por CLAE-UV-ESI-EM/EM de los extractos seleccionados

La composición de compuestos fenólicos presentes en los EEAs que disminuyeron significativamente el número de inclusiones intracelulares de polyQ₇₉-EGFP (**Figura 33A**) fue analizada a través de la técnica de CLAE-UV-ESI-EM/EM. El análisis de los compuestos fenólicos a las longitudes de onda de 280 y 360 nm se realizó en polaridad negativa, mientras que para la identificación de antocianinas se realizó el análisis a 520 nm en polaridad positiva. Además, se llevó a cabo una semicuantificación relativa de cada compuesto identificado. La identificación y semicuantificación relativa de los compuestos fenólicos presentes en los extractos seleccionados se presenta en la **Tabla 12**.

En este análisis se detectaron 107 picos, de los cuales 105 fueron tentativamente identificadas a través de la comparación con la librería proporcionada por el CEPEDeq, la base de datos *ReSpect for phytochemicals* y la utilización de referencias bibliográficas (Peña-Cerda, Arancibia-Radich, Valenzuela-Bustamante, Pérez-Arancibia, Barriga, Seguel, Garcia, & Delporte, 2017; Wyrepkowski, Costa, Sinhorin, Vilegas, De Grandis, Resende, Varanda, & dos Santos, 2014). De los 105 compuestos tentativamente identificados, un importante porcentaje corresponde a derivados de flavonoles (65%) tales como derivados O-glicosilados de miricetina, quercetina y canferol, derivados de elagitaninos (11%), y ácidos fenólicos (8%) (**Figura 38**).

#	RT [min]	[M-H] [m/z]	Fragmentos [m/z]		Identificación tentativa	Semicuantificación relativa a la mayor área obtenida					
						EEA 14-4	EEA 19-1	EEA 19-1ha	EEA 23-2	EEA 27-1	
1	2,9	503,1	340,8	178,5	Dihexósido de ácido cafeico ^a	75,1	100	99,1	52,9	26,9	
2	5,2	633,2	586,8	300,9	HHDP-galoil hexosa ^{a,c}	19,5	100	0	0	21,9	
3	6	495,1	342,8	168,8	Ácido digaloil quínico ^{a,c}	2,2	35,2	100	30,5	75	
4	6,3	483,4	330,9	232,8	168,8	Digaloil glucosa ^a	0	100	0	0	0
5	6,3	633,1	420,9	300,8	HHDP-galoil hexosa ^{a,c}	0	61,9	0	0	100	
6	7,1	633	588,8	420,9	300,8	HHDP-galoil hexosa ^{a,c}	100	0	0	0	0
7	7,5	495,4	342,9	168,8	Ácido digaloil quínico ^{a,c}	27	33,4	100	25,7	85,3	
8	8,4	633	420,9	300,8	HHDP-galoil hexosa ^{a,c}	0	100	72,8	0	72,8	
9	8,6	577,2	425	450,9	Procianidina dímero B ^a	100	0	0	0	0	
10	8,7	503	340,7	178,8	Dihexósido de ácido cafeico ^a	0	100	0	0	0	
11	8,9	495,1	342,9	168,9	Ácido digaloil quínico ^{a,c}	7,5	2,8	51	37,2	100	
12	9,8	577,2	425	450	Procianidina dímero B ^a	100	0	0	0	0	
13	10,5	483,3	422,9	270,8	168,9	Digaloilglucosa ^a	100	0	38,8	0	0
14	10,7	633	482	300,9	HHDP-galoil hexosa ^{a,c}	100	0	0	0	0	
15	10,8	495,1	342,9	168,8	Ácido digaloil quínico ^{a,c}	44,1	60,5	73,7	38,7	100	
16	10,8	289,4	245		(Epi)catequina ^{a,b}	100	0	0	0	0	
17	12,2	289,4	245		(Epi)catequina ^{a,b}	100	8,6	0	0	0	
18	12,4	453,2	312,9	284,9	168,8	Digaloilpentosa ^a	0	0	100	0	0
19	13	625,4	463	300,9	Quercetina-O-dihexósido ^a	100	0	0	0	0	
20	13,1	325	163	145	N.I.	0	14,6	0	56,6	100	
21	13,1	431,3	268,9		Apigenina-O-glucósido ^a	0	100	0	0	0	
22	13,8	635	465	282,9	Trigaloil glucosa ^a	0	94,7	100	0	0	
23	14,2	631,2	479	317	Miricetina-O-galoil hexósido ^a	10,2	39,6	100	56,1	34,6	
24	15	453,5	312,9	168,9	Digaloilpentosa ^a	100	78,2	0	0	0	
25	15,4	631,3	479,1	317,1	Miricetina-O-galoil hexósido ^a	9,1	32,3	100	36,5	36,7	
26	15,6	635,3	464,9	270,7	Trigaloil glucosa ^a	0	100	0	0	0	
27	15,7	479,3	316,8		Miricetina-O-hexósido ^a	100	0	0	0	0	
28	15,7	447,5	284,9		Luteolina-O-hexósido/canferol-O-hexósido ^a	0	27,9	0	100	0	
29	15,9	401,5	268,9	130,8	Bencil-alcohol-hexosa-pentosa ^a	17,5	0	100	69,4	0	
30	15,9	577,1	424,9		Procianidina dímero B ^a	100	0	0	0	0	
31	16,1	453,3	312,9		Digaloilpentosa ^a	0	0	100	0	0	
32	16,2	479,1	316,8		Miricetina-O-hexósido ^a	89,3	24,7	65,1	100	84,5	
33	16,6	444,9	447,7	284,9	Canferol-O-hexósido ^a	0	0	100	0	0	
34	17	615,3	463	313	Quercetina-O-galoil hexósido ^a	0	31,9	100	0	47,4	
35	17	577	425		Procianidina dímero B ^a	100	0	0	0	0	
36	17	631,2	479	317	Miricetina-O-galoil hexósido ^a	6,8	100	58,7	38,4	77,4	
37	17,3	477,1	300,8		Quercetina-O-glucurónido ^a	0	100	0	0	0	

38	17,6	449,3	315,9			Miricetina-O-pentósido ^a	21,5	100	0	0	5,8
39	17,7	463,2	300,8			Quercetina-O-hexósido ^a	34,7	66,5	100	82,3	91,2
Semicuantificación relativa a la mayor área obtenida											
#	RT [min]	[M-H] [m/z]	Fragmentos [m/z]			Identificación tentativa	EEA 14-4	EEA 19-1	EEA 19-1ha	EEA 23-2	EEA 27-1
40	18,3	755,1	453	291		N.I.	73,8	0	0	100	13,2
41	18,5	479,2	316,9			Miricetina-O-hexósido ^a	10,1	1	73,4	100	62,8
42	18,7	433,2	300,8	170		Quercetina-O-pentósido ^a	100	0	0	0	0
43	19	625,2	462,9	300,8		Quercetina-O-dihexósido ^a	66,7	0	0	0	100
44	19,1	461,3	316,8			Miricetina-O-deoxihexósido ^a	30,9	0	0	100	0
45	19,1	615,2	463,1	301,1		Quercetina-O-galoil hexósido ^a	0	0	100	0	43,4
46	19,7	479,2	316,1	179		Miricetina-O-hexósido ^a	22,1	32,8	100	94,1	82,6
47	20	615,3	463	301,1		Quercetina-O-galoil hexósido ^a	19,7	11,8	100	72,8	41,2
48	20,4	625,2	462,9	300,9		Quercetina-O-dihexósido ^a	31,9	0	100	71,6	0
49	20,7	449,3	316,9			Miricetina-O-pentósido ^a	0	81,1	0	100	26,2
50	20,7	441,3	288,9	168,9		(Epi)catequina-O-galato ^{a,b}	100	0	0	0	0
51	20,8	433,2	300,8			Quercetina-O-pentósido ^a	90,6	24,1	100	86	71,9
52	21	615,4	463	301,1		Quercetina-O-galoil hexósido ^a	0	100	0	0	0
53	21,1	625,3	463	300,9		Quercetina-O-dihexósido ^a	0	0	100	0	0
54	21,2	463,2	315,9			Miricetina-O-ramnósido ^a	0	6	86,7	100	78,1
55	21,5	449,2	316			Miricetina-O-pentósido ^a	0	100	26	0	0
56	21,5	477,2	314,9			Isoramnetina-O-hexósido ^a	0	100	0	0	0
57	21,7	433,3	300,4			Quercetina-O-pentósido ^a	17,9	100	0	0	0
58	22	477	300,9			Quercetina-O-glucurónido ^a	19,2	0	100	28,2	36,7
59	22,6	463,1	300,9			Quercetina-O-hexósido ^a	100	16,6	58,3	73,3	39,4
60	22,6	301	300,8	257	178	Ácido elágico ^a	0	0	0	0	100
61	23	449,1	284,9	302,8	150,9	Taxifolina-O-ramnósido ^a	0	0	0	0	0
62	23	477	300,9			Quercetina-O-glucurónido ^a	49,2	1,2	98,6	0	100
63	23,1	463,1	300,9			Quercetina-O-hexósido ^a	0	0	0	0	100
64	23,6	625,3	462,9	300,9		Quercetina-O-dihexósido ^a	100	0	0	0	0
65	24,1	433,2	300,9			Quercetina-O-pentósido ^a	0	100	0	0	0
66	24,2	599,3	463	301		Quercetina-hexosa-ácido protocatéuico ^a	19,3	31	30,9	100	54,2
67	24,6	447,2	284	300	327	Canferol-O-hexósido ^a	0	4,2	100	0	6,5
68	24,7	433,2	300,9			Quercetina-O-pentósido ^a	0	100	4,4	18,9	15,8
69	25,1	447,2	300,9			Quercetina-O-ramnósido ^a	0	0	0	100	0
70	25,5	463,3	300,9	254,8	168,9	Quercetina-O-hexósido ^a	0	0	0	0	100
71	25,6	477	314,9			Isoramnetina-O-hexósido ^a	0	83	100	35,7	0
72	26	505,1	462,9	300,9		Quercetina-O-acetil hexósido ^a	19,2	0	40,9	100	0
73	26	461	284,9			Canferol-O-glucurónido ^a	0	0	0	100	0
78	27,1	613,2	316,9	463		Miricetina-O-galoil deoxihexósido ^a	0	0	0	100	0
79	27,2	417,3	283,9			Canferol-O-pentósido ^a	0	100	0	0	0
80	27,4	505,2	300,9	463,1	178,8	Quercetina-O-acetil hexósido ^a	38,3	2,9	63,4	78,2	100

81	27,9	625,3	463	300,9		Quercetina-O-dihexósido ^a	0	100	0	27,8	38,2
82	27,9	479,2	316,9			Miricetina-O-hexósido ^a	0	0	79,9	100	53,2
Semicuantificación relativa a la mayor área obtenida											
#	RT [min]	[M-H] [m/z]	Fragmentos [m/z]			Identificación tentativa	EEA 14-4	EEA 19-1	EEA 19-1ha	EEA 23-2	EEA 27-1
83	28	463,2	300,9			Quercetina-O-hexósido ^a	0	0	0	100	0
84	28,2	315,2	299,9	178,8	106,9	Isoramnetina ^{a,c}	100	0	0	0	0
85	28,3	639,2	492,9	330,9		Metoxiquercetina-O-hexósido ^a	0	55,2	0	0	100
86	28,4	417,4	284,9			Canferol-O-pentósido ^a	0	100	0	0	0
87	28,5	475,6	299,9			Luteolina-metiléter-O-glucurónido ^a	0	100	0	0	0
88	28,5	505,2	486,9	300,9		Quercetina-O-acetil hexósido ^a	3,8	1	70,8	100	50,2
89	28,6	301,1	299,8			Ácido elágico ^{a,b,c}	0	0	0	0	100
90	28,9	431,2	284,9			Canferol-O-ramnósido ^a	0	0	100	0	0
91	29,4	489,5	447,1	314,9	283,9	Isoramnetina-O-glucurónido ^a	0	0	100	0	0
92	29,6	645,4	478,9	316,9		Galoilmetilmiricetina hexósido ^a	0	29,5	100	0	18
93	30,2	609,5	463	301,1		Quercetina-O-ramnosil hexósido ^a	0	100	77,2	40,7	48,2
94	30,6	639,2	463	301		Isoramnetina-O-dihexósido ^a	0	0	100	72	50,4
95	31,2	489,3	284,8	227		Canferol-O-acetil hexósido ^a	0	0	100	0	47,6
96	31,4	606,9	462,9	300,9		Quercetina-O-ramnosil hexósido ^a	100	0	0	0	0
97	31,5	645,4	479	315,9		Galoilmetilmiricetina hexósido ^a	0	0	100	30,9	0
98	31,8	609,4	463,9	300,9		Quercetina-O-ramnosil-O-hexósido ^a	0	0	0	53,6	100
99	32	593,3	447	284,9		Canferol-O-cumaroil glucósido ^a	0	0	100	40,5	0
100	32,4	301	178,9	150,9		Quercetina ^{a,b,c}	100	19,2	99,5	63,6	46,7
101	32,4	331	315,9			Miricetina metiléter ^a	0	0	100	40,2	5,8
102	32,7	623,4	477,1	314,9		Isoramnetina-O-rutinósido ^a	0	100	0	0	26,3
103	33,6	595,4	579,4	286,8		Eriodictiol-O-rutinósido ^a	0	0	100	0	0
104	35,3	301,1	300,8			Ácido elágico ^{a,b}	0	0	0	0	0
105	36	285,2	284,9			Canferol ^{a,b,c}	0	7,4	100	3,4	8,6
106	36,4	315,4	299,9			Isoramnetina ^{a,b}	0	16,2	29	0	100
107	36,8	462,1	300,8	180,8		Quercetina-O-hexósido ^a	0	0	0	0	100

Tabla 12. Identificación y semicuantificación relativa de compuestos fenólicos en los extractos seleccionados. El análisis por CLAE-UV-ESI-EM se llevó a cabo a 280 nm. Los datos obtenidos fueron analizados utilizando el software Bruker DataAnalysis 3.2 (Bruker Daltonik GmbH, DE). La identificación tentativa de los compuestos se llevó a cabo a través de la comparación de las masas de los iones moleculares y sus patrones de fragmentación con los datos de una librería de compuestos fenólicos provista por el CEPEDQ y la utilización de la base de datos ReSpect for phytochemicals, sumado a la revisión de literatura científica. [M-H] = ión molecular; Tr = Tiempo de retención; min. = minutos; (a) Librería CEPEDQ; (b) ReSpect for phytochemicals; (c) Referencias bibliográficas (Peña-Cerda, Arancibia-Radich, Valenzuela-

Bustamante, Pérez-Arancibia, Barriga, Seguel, Garcia, & Delporte, 2017; Wyrepkowski, Costa, Sinhorin, Vilegas, De Grandis, Resende, Varanda, & dos Santos, 2014).

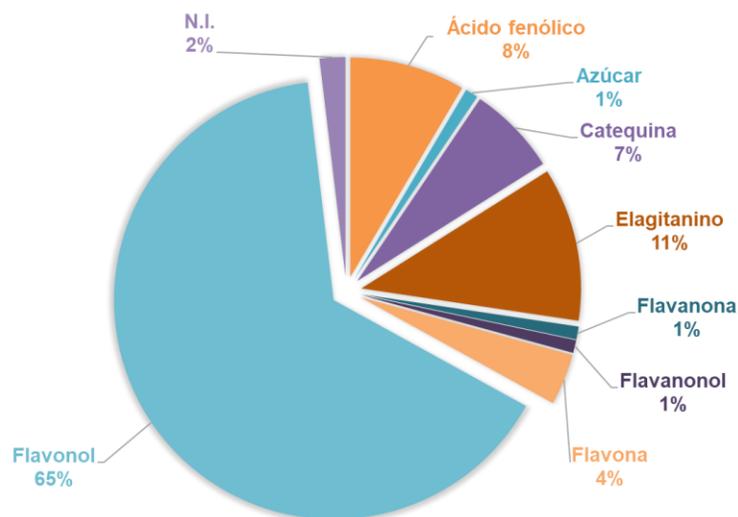


Figura 38. Distribución de subtipos de compuestos polifenólicos tentativamente identificados en el análisis por CLAE-UV-ESI-EM. El análisis por CLAE-UV-ESI-EM se llevó a cabo a 280 nm. Los datos obtenidos fueron analizados utilizando el software Bruker DataAnalysis 3.2 (Bruker Daltonik GmbH, DE). La identificación tentativa de los compuestos se llevó a cabo a través de la comparación de las masas de los iones moleculares y sus patrones de fragmentación con los datos de una librería de compuestos fenólicos provista por el CEPEDeq y la utilización de la base de datos ReSpect for phytochemicals, sumado a la revisión de literatura científica. CLAE = Cromatografía líquida de alta eficiencia; ESI = ionización por electrospray; EM = espectrometría de masas; N.I. = no identificado.

En la **Figura 39** se exponen los cromatogramas obtenidos a 280 nm, destacando los picos más importantes seleccionados a partir de este análisis. De éstos 8 compuestos, 6 fueron tentativamente identificados, y los compuestos (1), (2), (4), (5), (7), y (8) están presentes en los 5 ESeI (**Figura 39**). Los picos corresponden a (1) un derivado de ácido cafeico ($m/z = 503$; Tr ~ 2,9 min.), (2) ácido digaloil quínico ($m/z = 495$; Tr ~ 7,5 min.), (3) un compuesto no identificado ($m/z = 325$; Tr ~ 13,1 min.), (4 y 5) 2 derivados de miricetina ($m/z = 631$ y 479 ; Tr ~ 14,2 y 16,2 min, respectivamente), (6) compuesto no identificado ($m/z = 755$; Tr ~ 18,5 min.), (7) un O-hexósido de quercetina ($m/z = 463$; Tr ~ 22,6 min.), y (8) quercetina ($m/z = 301$; Tr ~ 32,4 min.).

De acuerdo con la semicuantificación relativa llevada a cabo a partir de los resultados obtenidos, el EEA 19-1 presentó una mayor cantidad relativa del derivado dihexósido de ácido cafeico ($[M-H]^- = 503$, Tr $\sim 2,9$ min) entre los 5 ESel. Según los datos de espectrometría de masas, este compuesto presentó 2 fragmentos de $m/z = 340,8$ y $m/z = 178,5$, que representan la pérdida de sus hexosas $[M-162-H]^-$. Respecto del ácido digaloiil quínico ($[M-H]^- = 495$; Tr $\sim 7,5$ min), el EEA 19-1 ha es el que lo presentó en una mayor concentración relativa respecto de los demás EEAs, mientras que el EEA 23-2 lo presentó en una menor concentración relativa. Los fragmentos observados para este compuesto fueron el fragmento $m/z = 342,9$, que corresponde al fragmento luego de la pérdida de un grupo galoiil $[M-152,5-H]^-$ y el fragmento $m/z = 168,8$ que corresponde a ácido gálico luego de la pérdida de ácido quínico (Wyrepkowsky et al, 2014). Respecto del pico (3) (**Figura 39**), este compuesto no identificado se observó en los EEAs de los genotipos 19-1, 23-2 y 27-1, encontrándose más concentrado en este último. La presencia del derivado O-galoiil hexósido de miricetina (4) ($m/z = 631$, Tr $\sim 14,2$ min) se observó en los 5 extractos seleccionados, siendo en el EEA 19-1 ha donde se presentó en una mayor concentración relativa. Se observó que este compuesto presentó un fragmento de $m/z = 479$ que corresponde a la pérdida del grupo galoiil $[M-152-H]^-$ y el fragmento de $m/z = 317$, que corresponde a la pérdida consecutiva del grupo hexósido ($m/z = 162$) (Saldanha, Vilegas, & Dokkedal, 2013). El pico (5) fue tentativamente identificado en los 5 extractos seleccionados y correspondería a un derivado O-hexósido de miricetina ($m/z = 479$; Tr $\sim 16,2$ min) con una mayor concentración en el EEA 23-2. Este compuesto se fragmentó dando como resultado un fragmento de $m/z = 316,8$, que corresponde a la pérdida del grupo hexósido $[M-162,3-H]^-$. El pico 6 corresponde a un compuesto no identificado ($m/z = 755$; Tr $\sim 18,5$ min.) que se presentó en los EEAs de los genotipos 14-4, 23-2 y 27-1. El pico 7, que fue tentativamente identificado como un derivado O-hexósido de quercetina ($m/z = 463$; Tr $\sim 22,6$ min), se encuentra presente en los 5 extractos seleccionados, siendo mayor su concentración en el EEA 14-4. Este derivado de quercetina presentó un fragmento de $m/z \sim 301$ $[M-162-H]^-$, lo que confirmaría la presencia de un grupo hexósido en la molécula. Por lo tanto, este O-hexósido podría corresponder a los compuestos isoquercitrina o hiperósido, ambos flavonoles de peso molecular ~ 464 g/mol que se diferencian en el hexósido de la posición 3: la isoquercitrina presenta un residuo beta-D-glucosil, mientras que el hiperósido presenta un residuo beta-D-galactosil. El pico (8) fue tentativamente

identificado como quercetina ($m/z = 301$; $Tr \sim 32,4$ min) y se encuentra presente en los 5 EEAs analizados, siendo mayor su concentración en el EEA 14-4.

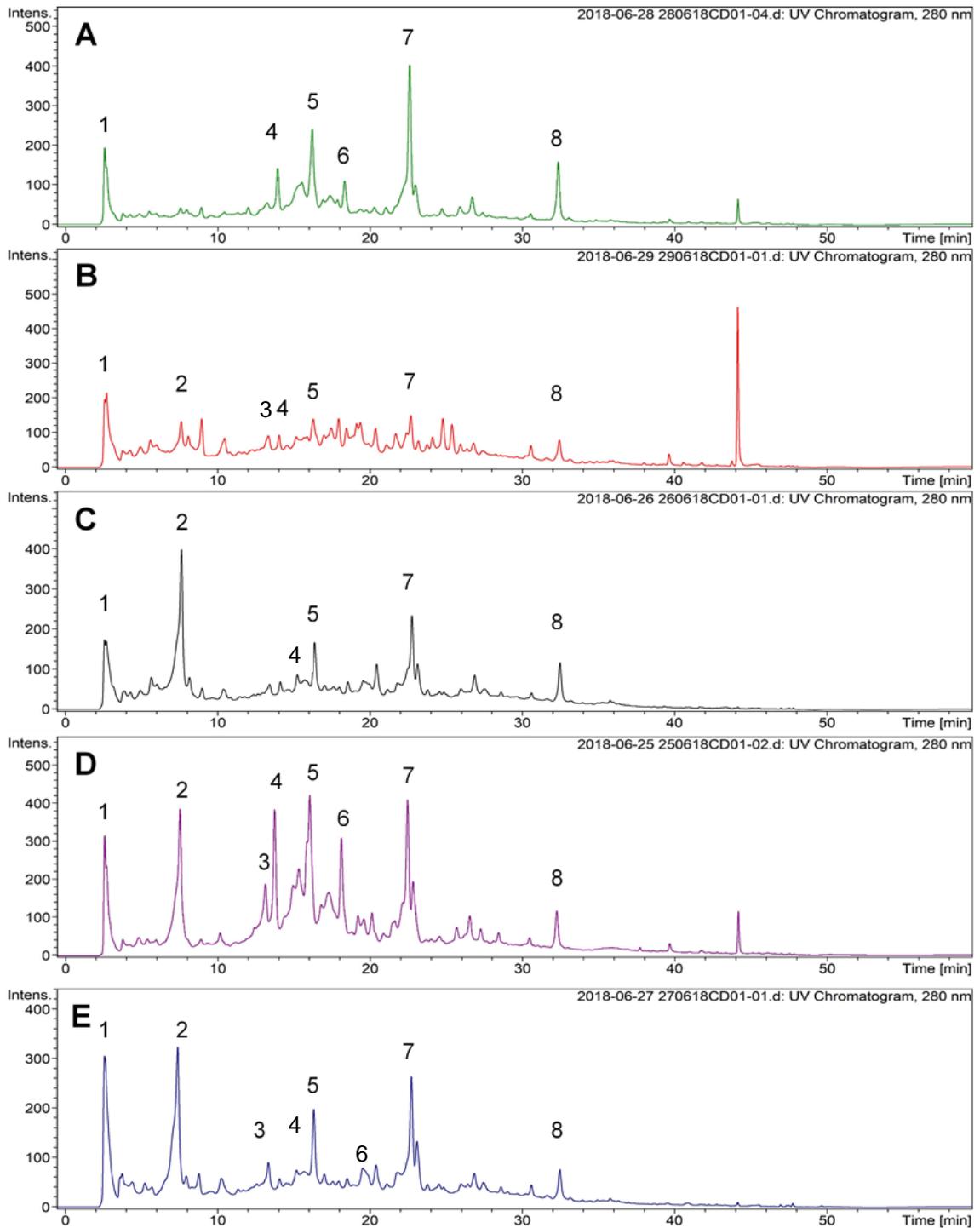


Figura 39. Cromatogramas a 280 nm de los extractos seleccionados. Se analizaron los EEAs

de los genotipos 14-4 **(A)**, 19-1**(B)**, 19.1ha **(C)**, 23-2 **(D)** y 27-1 **(E)**. *Continúa en la página siguiente.*

Continuación Figura 38. Donde: **(1)** Dihexósido de ácido cafeico (m/z 503; Tr ~ 2,9 min); **(2)** Ácido digaloil quínico (m/z = 495; Tr ~ 7,5 min), **(3)** Compuesto no identificado (m/z = 325; Tr ~ 13,1 min). **(4)** Miricetina-O-galoil hexósido (m/z = 631; Tr ~ 14,2 min), **(5)** Miricetina-O-hexósido (m/z = 479; Tr ~16,2 min), **(6)** Compuesto no identificado (m/z = 755; Tr ~ 18,5 min), **(7)** quercetina- O-hexósido (m/z = 463; Tr ~ 22,6 min) y **(8)** quercetina (m/z = 301; Tr ~ 32,4 min). Los datos obtenidos fueron analizados utilizando el software Bruker DataAnalysis 3.2 (Bruker Daltonik GmbH, DE). La identificación de los compuestos se llevó a cabo a través de la comparación de las masas de los iones moleculares y sus patrones de fragmentación con los datos de una librería de compuestos fenólicos provista por el CEPEDQ y la utilización de la base de datos ReSpect for phytochemicals, sumado a la revisión de literatura científica.

#	Tr (min)	[M-H] (m/z)	Fragmentos (m/z)			Identificación tentativa	Referencias
1	2.9	503	341	179		Dihexósido de ácido cafeico	a,b
2	5.2	633	587	301		HHDP-galoil hexosa	a,c
3	6.3	483	331	233	169	Digaloil glucosa*	a
4	8.4	633	421	301		HHDP-galoil hexosa	a,c
5	8.7	503	341	179		Dihexósido de ácido cafeico*	a,b
6	13.1	431	269			Apigenina-O-glucósido*	a
7	15.6	635	465	271		Trigaloil glucosa*	a
8	17.0	631	479	317		Miricetina-O-galoil hexósido	a
9	17.3	477	301			Quercetina-O-glucurónido*	a
10	17.6	449	316			Miricetina-O-pentósido	a
11	21.0	615	463	301		Quercetina-O-galoil hexósido*	a
12	21.5	449	316			Miricetina-O-pentósido	a
13	21.5	477	315			Isoramnetina-O-hexósido*	a
14	21.7	433	300			Quercetina-O-pentósido	a
15	24.7	433	301			Quercetina-O-pentósido	a
16	27.2	417	284			Canferol-O-pentósido*	a
17	27.9	625	463	301		Quercetina-O-dihexósido	a
18	28.4	417	285			Canferol-O-pentósido*	a
19	28.5	476	300			Luteolina-metiléter-O-glucurónido*	a
20	30.2	610	463	301		Quercetina-O-ramnosilhexósido	a
21	32.7	623	477	315		Isoramnetina-O-rutinósido	a

Tabla 13. Identificación tentativa de los compuestos polifenólicos con una mayor concentración relativa en el EEA del genotipo 19-1. La identificación tentativa de los compuestos se realizó a través de la comparación de las masas de los iones moleculares y sus

patrones de fragmentación con los datos de una librería de compuestos fenólicos provista por el CEPEDQ y la utilización de la base de datos ReSpect for phytochemicals, sumado a la revisión de literatura científica. **Continúa en la página siguiente**

Continuación Tabla 13. A partir de la semicuantificación relativa se identificaron aquellos compuestos con una mayor concentración relativa en el EEA del genotipo 19-1 en comparación a los otros extractos seleccionados. * representa compuestos que sólo fueron identificados en el EEA del genotipo 19-1. (a) Librería CEPEDQ; (b) ReSpect for phytochemicals; (c) Referencias bibliográficas (Peña-Cerda, Arancibia-Radich, Valenzuela-Bustamante, Pérez-Arancibia, Barriga, Seguel, Garcia, & Delporte, 2017; Wyrepkowski, Costa, Senhorin, Vilegas, De Grandis, Resende, Varanda, & dos Santos, 2014).

Más específicamente, en el EEA 19-1 se identificaron 11 compuestos cuya concentración relativa fue mayor en comparación a los otros extractos seleccionados (**Tabla 13**). Además, 10 compuestos solo fueron identificados en aquel extracto, entre los que destacan derivados glicosilados de quercetina y miricetina (**Tabla 13**)

Los resultados obtenidos en el análisis a 360 nm por CLAE-UV-ESI-EM/EM son similares a los obtenidos a 280 nm. Se lograron identificar tentativamente 92 compuestos, en los cuales destacaron diversos derivados de quercetina, miricetina y canferol. Una tabla resumen con los resultados y los cromatogramas obtenidos a 360 nm se presenta en el **Anexo IV**.

El análisis de la presencia de antocianinas en los extractos seleccionados se realizó en paralelo a una absorbancia de 520 nm en modo polaridad positiva. Los resultados se resumen en la **Tabla 14**. A partir de los datos obtenidos, se logró detectar e identificar tentativamente 21 picos correspondientes a diversas antocianinas en los extractos seleccionados. Entre los compuestos tentativamente identificados se encuentran antocianinas tales como los derivados O-hexósidos de cianidina, peonidina, malvidina, delphinidina y petunidina, y también las antocianidinas peonidina, delphinidina, malvidina y petunidina, las cuales han sido definidas como las antocianidinas de más común ocurrencia en los frutos rojos (Veberic, Slatnar, Bizjak, Stampar, & Mikulic-Petkovsek, 2015). Los cromatogramas obtenidos a 520 nm para la identificación de antocianinas se muestran en la **Figura 40**.

#	Tr [min]	[M+H] [m/z]	Fragmentos [m/z]			Identificación tentativa	EEA 14-4	EEA 19-1	EEA 19-1ha	EEA 23-2	EEA- 27-1
1	16.2	449.3	287,2			Cianidina-O-hexósido ^{a,b}	n.i.	*	*	*	n.i.
2	18.7	463.2	301,2			Peonidina-O-hexósido ^a	*	*	*	*	n.i.
3	19.0	301.3	286,1			Peonidina ^a	n.i.	n.i.	n.i.	n.i.	*
4	19.5	463.2	301,6			Peonidina-O-hexósido ^{a,b}	n.i.	*	n.i.	n.i.	n.i.
5	19.6	517.4	355,3			Malvidina-O-hexósido acetaldehído ^a	n.i.	n.i.	n.i.	*	n.i.
6	19.9	303.3	257,1	229,2	165,1	Delfinidina ^a	n.i.	n.i.	*	n.i.	*
7	20.0	331.4	315,2	179,2		Malvidina ^a	n.i.	n.i.	n.i.	*	n.i.
8	20.2	493.4	331,2			Malvidina-O-hexósido ^a	n.i.	*	n.i.	n.i.	n.i.
9	22.6	465.1	303,1			Delfinidina-O-hexósido ^a	*	n.i.	n.i.	*	n.i.
10	23.0	449.4				Cianidina-O-hexósido ^{a,b}	*	*	n.i.	n.i.	n.i.
11	23.2	517.3	355,1			Malvidina-O-hexósido acetaldehído ^a	n.i.	n.i.	n.i.	*	n.i.
12	23.3	465.0	303,1			Delfinidina-O-hexósido ^a	*	n.i.	n.i.	n.i.	*
13	23.4	487.6	325	185,1		Delfinidina-O-hexósido (aducto de sodio) ^a	n.i.	*	n.i.	n.i.	n.i.
14	23.8	317.3	302,1	153,1		Petunidina ^a	n.i.	n.i.	n.i.	n.i.	*
15	24.4	435.3	303,1			Delfinidina-O-pentósido ^a	n.i.	*	n.i.	n.i.	n.i.
16	25.4	501.4				Petunidina-O-hexósido (aducto de sodio) ^a	*	n.i.	n.i.	n.i.	n.i.
17	25.9	303.4				Delfinidina ^a	*	n.i.	n.i.	n.i.	n.i.
18	26.2	301.3	286,2			Peonidina ^a	n.i.	n.i.	n.i.	*	n.i.
19	26.7	501.5				Petunidina-O-hexósido (aducto de sodio) ^a	*	n.i.	n.i.	n.i.	n.i.
20	26.8	317.4	302,1	139		Petunidina ^a	n.i.	*	n.i.	n.i.	n.i.
21	26.8	479.0	317,2			Petunidina-O-hexósido ^{a,b}	n.i.	n.i.	*	n.i.	n.i.

Tabla 14. Identificación tentativa de antocianinas en los ESeI. El análisis por CLAE-UV-ESI-EM se realizó a 520 nm en modo polaridad positiva. Los datos obtenidos fueron analizados utilizando el software Bruker DataAnalysis 3.2 (Bruker Daltonik GmbH, DE). La identificación de los compuestos se llevó a cabo a través de la comparación de las masas de los iones moleculares y sus patrones de fragmentación con los datos de una librería de compuestos fenólicos provista por el CEPEDeq y la utilización de la base de datos ReSpect for phytochemicals, sumado a la revisión de literatura científica. Donde [M-H] = ión molecular; Tr = tiempo de retención; min. = minutos; (a) librería CEPEDeq; (b) ReSpect for phytochemicals; n.i. = no identificado; * = identificado.

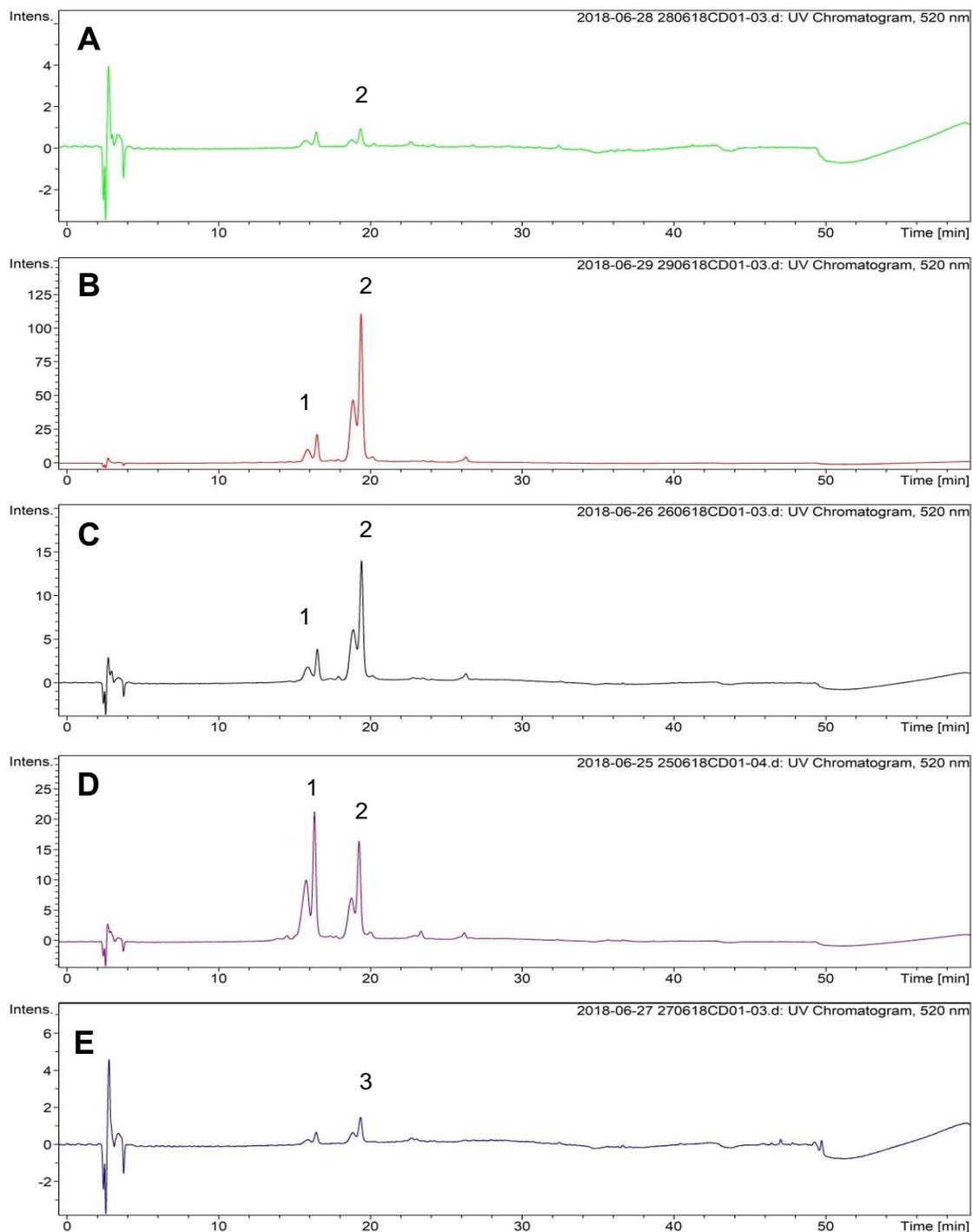


Figura 40. Cromatogramas UV a 520 nm obtenidos desde los análisis CLAE-UV-EM de los Esel. Se analizaron los EEAs de los Gs 14-4 (A), 19-1(B), 19.1ha (C), 23-2 (D) y 27-1 (E). Los

datos obtenidos fueron analizados utilizando el software Bruker DataAnalysis 3.2 (Bruker Daltonik GmbH, DE). La identificación de los compuestos se llevó a cabo a través de la comparación de las masas de los iones moleculares y sus patrones de fragmentación con los datos de una librería de compuestos fenólicos provista por el CEPEDeq y la utilización de la base de datos ReSpecT for phytochemicals, sumado a la revisión de literatura científica. Dónde: **(1)** cianidina-O-hexósido; **(2)** Peonidina-O-hexósido; **(3)** Peonidina.

Como se puede observar en la **Figura 40**, los perfiles de los cromatogramas obtenidos a 520 nm son similares, con 2 picos principales ($T_r \sim 16,2$ min. Y $T_r \sim 18,7$) cuya intensidad es baja en comparación a los picos obtenidos en el análisis a 280 nm (**Figura 39**) y 360nm (**Anexo III**), resultados que se correlacionan a los obtenidos en el análisis por CCF (**Figura 15**), CCF de alta resolución (**Figuras 18 y 19**), y CLAE-DAD (**Figuras 24 y 25**). Cabe destacar que la identificación tentativa de estos picos varía de acuerdo con el genotipo. El pico 1 (**Figura 40**) correspondería a un derivado O-hexósido de cianidina (ión molecular con una $m/z = 449$) con presencia en los EEAs de los genotipos 19-1, 19-1ha y 23-2 (**Figuras 40B, C y D, respectivamente**). Este derivado presenta un fragmento de $m/z = 287$, por lo que podría corresponder al 3-O-glucósido de cianidina (Veberic, Slatnar, Bizjak, Stampar, & Mikulic-Petkovsek, 2015). El pico 2 (**Figura 40**) correspondería a un derivado O-hexósido de peonidina (ión molecular con una $m/z = 463$), el cual se logró identificar en los EEAs de los genotipos 14-4, 19-1, 19-1ha y 23-3 (**Figuras 40A, B, C y D, respectivamente**). Este compuesto presenta un fragmento de $m/z = 301$, por lo que podría corresponder al 3-O-glucósido de peonidina (Veberic et al., 2015; *ReSpecT for Phytochemicals*). El pico 3 que está presente en el genotipo 27-1 (**Figura 40E**) posee un T_r similar al pico 2, y podría corresponder a la antocianidina peonidina (ión molecular con una $m/z = 301$).

Tomando en cuenta las antocianinas y antocianidinas anteriormente mencionadas, un total de 126 compuestos fueron tentativamente identificados en los 5 extractos seleccionados de los frutos de distintos genotipos de murtila. De estos 126 compuestos tentativamente identificados, una gran mayoría corresponden a derivados de los flavonoles quercetina, miricetina y canferol. De los resultados obtenidos se puede destacar que, a pesar de que existen diferencias en los perfiles de los ESEL (**Figuras 39 y 40**), las cuales se reflejan claramente en la presencia o ausencia de los 8 picos destacados en la **Figura 39**, los compuestos tentativamente identificados son similares en todas las muestras analizadas. En los 5 extractos seleccionados predominan los

derivados de quercetina, miricetina y canferol, y hay una menor presencia de ácidos fenólicos, elagitaninos, catequinas y antocianinas, en las cuales predomina la presencia de derivados glicosilados de cianidina, delfinidina, peonidina y petunidina.

En resumen, a partir de los frutos maduros de 8 genotipos de murtila se obtuvieron extractos utilizando maceración exhaustiva con solventes de polaridad creciente (EDCMs, EACs, EEAs). Los EACs y EEAs fueron seleccionados debido a que, por la polaridad de los solventes utilizados para su obtención, concentran los compuestos de tipo polifenólico. Para realizar una caracterización química de estos extractos, se utilizaron técnicas tanto espectrofotométricas (Folin-Ciocalteu), como cromatográficas (CCF, CCF de alta resolución, CLAE-DAD). Esto nos permitió llevar a cabo un análisis comparativo de la composición química de los EACs y EEAs, donde en general se pudo dar cuenta de que los EACs presentan una mayor concentración de polifenoles que los EEAs a pesar de la similitud del perfil de compuestos entre ambos grupos de extractos, y de que existen diferencias en la composición química de los 8 genotipos. Luego, se analizó el efecto del tratamiento con los EACs y EEAs sobre la formación de inclusiones intracelulares de polyQ₇₉-EGFP, observando que el tratamiento con 5 EEAs (EEA 14-4, 19-1, 19-1ha, 23-2 y 27-1) redujo significativamente el número de inclusiones luego de 16 h de tratamiento. Luego se analizó la capacidad de estos 5 extractos seleccionados de reducir los niveles de las especies de alto peso molecular (EAPM) de polyQ₇₉-EGFP y mHTT_{Q85}-GFP utilizando la técnica de *Western blot*, observando que solo el tratamiento con el EEA 19-1 redujo de manera significativa los niveles de las EAPM de polyQ₇₉-EGFP y mHTT_{Q85}-EGFP, mientras que los EEAs de los genotipos 23-2 y 27-1 redujeron los niveles de las EAPM de mHTT-EGFP sin ser estos resultados estadísticamente significativos. Además, se utilizó el péptido polyQ₁₁-EGFP como control, observando que el tratamiento con los extractos no afectó los niveles de este péptido. Por último, se analizó la composición química de los 5 extractos seleccionados a través de la técnica de CLAE-UV-ESI-EM/EM, donde se pudo identificar tentativamente la presencia de 126 moléculas entre las que destacó la presencia de distintos derivados glicosilados de quercetina, miricetina y canferol.

VI. Discusión

1. Rendimiento del proceso de extracción

Para la obtención de los extractos secos de los frutos de distintos genotipos de murtila se utilizó la técnica de maceración simple con solventes de polaridad creciente a temperatura ambiente. Esta técnica ha sido implementada previamente en nuestro laboratorio para la extracción de compuestos bioactivos desde las hojas de murtila (Arancibia-Radich et al., 2016; Peña-Cerda et al., 2017), y es una técnica ampliamente utilizada en el estudio químico de productos naturales (Cujic, Savikin, Jankovic, Pljevljakusic, Zdunic, & Ibric, 2016). Se trabajó con el material vegetal liofilizado para eliminar la presencia de agua en las muestras recolectadas. Esto se realizó con la finalidad de detener los procesos enzimáticos que podrían alterar la composición química de los frutos de murtila recolectados, como también la descomposición del material vegetal. Además, los frutos fueron triturados para aumentar la superficie de contacto del material vegetal con el solvente, haciendo más eficiente el proceso de extracción.

Cabe destacar que en el proceso de liofilizado se perdió, en promedio, un 75% del peso de los frutos, lo que refleja la gran cantidad de agua que presentan estas bayas (**Anexo II**). Se eligió la técnica de liofilizado debido a que, en comparación al secado por corriente de aire a T° ambiente, la liofilización retiene un mayor porcentaje de compuestos fenólicos en el material vegetal (Dai & Mumper, 2010). La maceración se llevó a cabo en una relación sólido:solvente de 1:5 (50 g de fruto + 250 mL de solvente). Si bien ha sido descrito que aumentar la relación sólido:solvente a 1:20 o 1:30 permite aumentar los rendimientos de la extracción (Cujic, Savikin, Jankovic, Pljevljakusic, Zdunic, & Ibric, 2016), se decidió utilizar una relación más pequeña, debido a que la extracción fue realizada hasta el completo agotamiento del material vegetal.

Los solventes utilizados para la extracción del material vegetal fueron el diclorometano, acetona y etanol acidificado con un 1% de ácido fórmico (**Figura 3**). El objetivo de utilizar estos solventes de extracción fue el de concentrar los compuestos más lipofílicos y la clorofila en el EDCM, para luego concentrar los compuestos fenólicos en los EACs y EEAs que corresponden a los extractos de interés. En el caso de la utilización de ácido fórmico, la acidificación se utilizó para lograr extraer las antocianinas presentes en los frutos, debido a que estos compuestos son más estables a pHs ácidos. Los extractos

obtenidos fueron concentrados en un rotavapor y luego secados en estufa al vacío a temperaturas que no superaron los 70°C, para así evitar la descomposición de los compuestos fenólicos.

Como se esperaba, existieron diferencias evidentes en el rendimiento de la extracción entre los diferentes genotipos de frutos de murtila, tanto para los EACs como para los EEAs (**Tabla 6; Figura 8**). Aunque la polaridad de la acetona y el etanol son similares, hubo diferencias significativas entre los rendimientos de los extractos obtenidos con los diferentes solventes (**Figura 8**), que promediaron alrededor del 2% para los EACs y 22% para los EEAs (**Tabla 6**). Esta diferencia en los rendimientos obtenidos podría explicarse, en parte, por la presencia de un pequeño porcentaje de ácido (1%) en el etanol utilizado para obtener los EEAs, lo que podría haber facilitado la entrada del solvente a través de la membrana de aquellos organelos en los cuales se acumulan los compuestos polifenólicos por disrupción de ésta (Pompeu, Silva, & Rogez, 2009).

Además, los solventes próticos, como el etanol, son capaces de provocar un hinchamiento de la celulosa generando una disrupción de las interacciones entre esta última y compuestos como los polifenoles, lo que facilita su extracción. En parte, esto podría explicarse por su capacidad de formar puentes de hidrógeno (Zuorro & Lavecchia, 2013). Por otro lado, los solventes apróticos como la acetona no tienen la capacidad de formar puentes de hidrógeno, y por lo tanto tendrían una menor capacidad de provocar hinchamiento de la celulosa (Zuorro, Iannone, & Lavecchia, 2019). La naturaleza de los solventes (prótico v/s aprótico) y su capacidad de formar puentes de hidrógeno también sería importante para el proceso de solubilización de las moléculas de interés, que en este caso corresponden a compuestos polifenólicos. En este contexto, se ha observado que aquellos compuestos que presentan grupos hidroxilos en sus estructuras (por ejemplo, flavonoides) son extraídos más eficientemente con solventes próticos, como el etanol, debido a la formación de enlaces puentes de hidrógeno, mientras que aquellos compuestos que no presentan grupos hidroxilos serían extraídos con solventes apróticos, como la acetona, a través de interacciones dipolo-dipolo (Galanakis, Goulas, Tsakona, Manganaris, & Gekas, 2013).

De forma general, es importante considerar que la extracción de compuestos desde fuentes naturales es un proceso complejo y heterogéneo que depende, entre otras cosas, de: (1) la capacidad de los solventes utilizados de penetrar en la matriz del material vegetal, (2) la rotura de las interacciones de los compuestos de interés con la matriz del material vegetal y (3) la capacidad del solvente de solubilizar al soluto (Zuorro, Iannone, & Lavecchia, 2019). En general, la presencia de celulosa en la pared celular de las células vegetales dificulta la penetración de los solventes, lo que a su vez dificulta la extracción de los metabolitos secundarios de interés (Albersheim, Darvill, Roberts, Sederoff, & Staehelin, 2011; Zuorro, Iannone, & Lavecchia, 2019).

Cabe destacar que no se observó una relación entre los rendimientos del proceso de extracción de los frutos recolectados, y los criterios de selección utilizados en la recolección (cantidad de hojas o calidad de los frutos; **Tabla 1**). Los antecedentes expuestos anteriormente nos entregan los primeros resultados demostrando la existencia de diferencias, al menos, cuantitativas en la composición química de los 8 genotipos estudiados. Para poder dar cuenta de estas diferencias se realizó una caracterización química de los extractos, cuyos resultados se discuten a continuación.

2. Perfil polifenólico de los extractos obtenidos a partir de frutos los distintos genotipos de murtila

Para dar cuenta del perfil de compuestos polifenólicos de los distintos genotipos analizados, se utilizaron técnicas espectrofotométricas y cromatográficas con la finalidad de poder realizar un análisis comparativo entre los distintos genotipos de murtila. El análisis espectrofotométrico utilizado fue la técnica de Folin-Ciocalteu, que corresponde a una técnica que es ampliamente utilizada para la determinación del contenido de compuestos fenólicos presentes en una gran variedad de matrices, tales como comidas, bebidas, diferentes hierbas y también en extractos provenientes de plantas (Margraf, Karnopp, Rosso, & Granato, 2015). Las técnicas cromatográficas utilizadas fueron la CCF, CCF de alta resolución y CLAE-DAD. A través de estas técnicas fue posible obtener una '*huella digital*' de cada una de las muestras analizadas, lo que nos permitió realizar un análisis comparativo del perfil químico de los extractos obtenidos de los frutos de diferentes genotipos de murtila.

2.1 Análisis del contenido de fenoles totales de los extractos obtenidos a partir de frutos de distintos genotipos de murtila

A partir del análisis del CFT se pudo dar cuenta de que existen diferencias significativas en la composición de compuestos polifenólicos de los EACs y EEAs (**Figuras 10 y 11**). Considerando que los 8 genotipos recolectados para este estudio fueron cultivados bajo las mismas condiciones edafoclimáticas, las diferencias determinadas en el CFT se pueden atribuir a las diferencias genotípicas de los arbustos de murtila. Estas diferencias podrían verse reflejadas, en parte, en los niveles de las enzimas responsables de la biosíntesis de los compuestos polifenólicos en estos frutos. Sin embargo, hasta la fecha, no existen estudios que hayan analizado comparativamente los niveles de este tipo de enzimas en los distintos genotipos de murtila. Al comparar los valores de CFT entre ambos sets de extractos, se observó que los EACs presentaron valores significativamente mayores en comparación a los EEAs (**Figura 12**). Estos resultados nos indicarían que los EACs, a pesar de su bajo rendimiento de extracción, contienen un mayor número de compuestos fenólicos que los EEAs. Sin embargo, se ha reportado que el reactivo de Folin-Ciocalteu es capaz de reaccionar con cualquier compuesto que tenga una capacidad reductora, sesgando el valor real del CFT (Granato, Santos, Maciel, & Nunes, 2016). Debido a esto, no se puede descartar que las diferencias encontradas entre los EACs y EEAs se deban, por ejemplo, a una mayor presencia de azúcares reductores o ácido ascórbico en los EACs. Es importante mencionar que ambos extractos obtenidos a partir de los frutos del genotipo 19-1, que corresponde a la variedad Red Pearl del INIA, destacaron por presentar valores de Folin más altos respecto de los otros genotipos analizados (**Figura 10 y 11**). Así, además de su valor comercial como fruto de exportación, los frutos de la variedad Red Pearl podrían ser considerados como recurso para la producción de alimentos funcionales o saludables, y fitofármacos.

Si bien otros investigadores han reportado el CFT de los frutos de murtila, la mayoría ha llevado a cabo los análisis en extractos globales hidro-alcohólicos de estos frutos, dificultando así la comparación con los resultados obtenidos en este estudio, donde se llevó a cabo una extracción seriada con solventes de polaridad creciente en frutos liofilizados y triturados para obtener extractos semipurificados. Por ejemplo, Augusto et al. (2014) reportaron que el extracto hidro-alcohólico de los frutos deshidratados del

genotipo 14-4 (INIA, Carillanca) presentaba un CFT de alrededor de 40,3 mg EAG/g peso seco, mientras que Junqueira-Gonçalves et al. (2015) reportaron un CFT de 210,0 mg EAG/g peso fresco en un extracto hidroalcohólico obtenido a partir de frutos del mismo genotipo (Augusto, Salinas, Alencar, D'Arce, Camargo, & Vieira, 2014; Junqueira-Gonçalves, Yanez, Morales, Navarro, R, & Zuniga, 2015). Estas diferencias podrían explicarse debido a las diferentes metodologías de extracción utilizadas, además de que las muestras fueron recolectadas en fechas distintas y procesadas de distinta forma. En el caso del estudio llevado a cabo por Augusto et al. (2014) se utilizaron frutos deshidratados recolectados durante el 2011, los que fueron extraídos utilizando una solución hidroalcohólica de etanol 49,6% v/v, mientras que Junqueira-Gonçalves et al. (2015) utilizaron los frutos frescos recolectados en el año 2009, los cuales fueron extraídos con una solución de etanol al 85% v/v.

Por otro lado, al comparar los valores de CFT de los extractos obtenidos a partir de los frutos de distintos genotipos de murtilla con aquellos extractos obtenidos de las hojas de los mismos genotipos (**Figura 13**), se pudo observar que los extractos obtenidos a partir de las hojas presentaron un mayor valor de CFT con respecto a los frutos. Estos resultados están en concordancia con los resultados obtenidos por Tian et al. (2017), quienes realizaron un estudio sistemático de la composición de compuestos fenólicos de hojas y frutos de 13 especies de *berries*, concluyendo que en general, las hojas son una fuente más rica en compuestos fenólicos que los frutos (Tian, Liimatainen, Alanne, Lindstedt, Liu, Sinkkonen, Kallio, & Yang, 2017). Esto podría explicarse porque la hoja es el órgano fotosintético de las plantas, presentando tanto una mayor exposición lumínica, como una mayor exposición a condiciones estresantes, lo que está relacionado a una mayor producción de especies reactivas del oxígeno (ROS). Este aumento de ROS provoca un aumento la biosíntesis de compuestos fenólicos antioxidantes, tales como los flavonoides (Agati, Azzarello, Pollastri, & Tattini, 2012; Agati, Brunetti, Di Ferdinando, Ferrini, Pollastri, & Tattini, 2013).

El análisis del CFT a través de la técnica espectrofotométrica de Folin corresponde a una primera aproximación a la caracterización química de los extractos obtenidos a partir de frutos de distintos genotipos de murtilla, caracterización que fue complementada con la utilización de técnicas cromatográficas para así llevar a cabo un análisis comparativo del perfil de compuestos químicos presentes en los extractos.

2.2 Análisis por CCF, CCF de alta resolución y análisis de componentes principales de los extractos obtenidos a partir de frutos de distintos genotipos de murtila

El reconocimiento de patrones en el perfil de compuestos químicos presentes en un extracto, o su *'huella digital'*, es clave en el análisis comparativo de un gran número de muestras provenientes de fuentes naturales. Estos patrones son de gran utilidad ya que nos pueden ayudar a correlacionar un perfil químico con variables tales como el área de recolección de las muestras o su actividad farmacológica, y también para dar cuenta de la autenticidad de las muestras de interés (Milojkovic-Opsenica et al., 2016). Diversas son las técnicas que nos permiten analizar el perfil químico de una muestra, sin embargo, y como ya ha sido mencionado, la CCF nos permite realizar un análisis rápido y sensible de una gran cantidad de muestras en paralelo (Milojkovic-Opsenica et al., 2013). Con la aplicación de dicha técnica, más la utilización de reactivos de derivatización y observación bajo luz UV de las placas desarrolladas, fue posible obtener como resultado imágenes con bandas de diversos colores, facilitando el análisis de las diferencias y similitudes en la composición química de las muestras en estudio.

En el análisis realizado por CCF se pudo dar cuenta específicamente del perfil de compuestos polifenólicos tanto de los EACs como de los EEAs (**Figuras 14, 15, y 16**). En general, a través de la derivatización con NP/PEG, se pudo observar la presencia de compuestos del tipo flavonoide en ambos set de extractos, más específicamente flavonoles, flavonas y sus derivados glicosilados, que luego de derivatizar y al observar bajo luz UV presentaban coloraciones amarillo-anaranjadas y amarillo-verdosas, respectivamente (Wagner & Bladt, 1996). La presencia de derivados del tipo flavonol, y más específicamente la presencia tentativa de quercetina y rutina, se pudo confirmar a través de la comparación con patrones de referencia (**Figura 16**). También se pudo observar la presencia de ácidos fenólicos, los cuales se pueden observar en las placas derivatizadas debido a la coloración azul que presentan bajo luz UV. Sin embargo, aunque los solventes utilizados presentan diferentes capacidades de extracción de compuestos polifenólicos (Galanakis, Goulas, Tsakona, Manganaris, & Gekas, 2013), las diferencias detectadas en el perfil de dichos compuestos entre los EACs y los EETs fueron principalmente cuantitativas y no cualitativas. Esto podría deberse, en parte, a que el protocolo de extracción utilizado contempló el total agotamiento del material

vegetal con cada solvente utilizado y a que la polaridad de estos solventes es similar, por lo que las diferencias observadas entre ambos grupos de extractos podrían ser más bien cuantitativas. Por otro lado, se lograron observar diferencias en la presencia de antocianinas entre los EACs y EEAs. Estos compuestos se pueden observar bajo luz visible debido a la presencia de bandas de colores rojizos (**Figuras 14A y 15A**). En general, los EACs presentaron bandas de mayor intensidad en comparación a los EEAs, donde solo el EEA del genotipo 19-1 presentó bandas correspondientes a antocianinas con una intensidad similar a la de los EACs. La mayor presencia de antocianinas en los EACs podría explicarse por la metodología de extracción secuencial y exhaustiva que se utilizó en este estudio. Así, las antocianinas pudieron haber sido extraídas mayoritariamente en la acetona, dejando solo un remanente para ser extraído con etanol.

2.3 Análisis por CCF de alta resolución y análisis de componentes principales de los extractos obtenidos a partir de frutos de distintos genotipos de murtila

En general, la presencia de metabolitos secundarios en las CCFs fue analizada visualmente luego de obtener fotografías de las placas tanto bajo luz visible como luz UV (365 nm), pudiendo así identificar la presencia tentativa de compuestos polifenólicos. Este análisis podría ser complementado comparando los Rfs y coloraciones de las bandas observadas con aquellos obtenidos por muestras de referencia certificada o sustancias químicas características de las muestras analizadas. Sin embargo, esta detección visual supone una desventaja, ya que el análisis está sujeto a la percepción del investigador que realiza dicho análisis (Milojkovic-Opsenica et al., 2013, Fichou et al., 2016). Por esta razón, se llevó a cabo un análisis por CCF de alta resolución complementado por un PCA. Este análisis exploratorio nos permitió reducir la dimensionalidad de los datos obtenidos a partir de la CCF de alta resolución para así poder agrupar las muestras analizadas (EACs y EEAs) de acuerdo con las similitudes en su composición química de una manera objetiva, es decir, sin la influencia de la percepción visual del investigador.

Para llevar a cabo el análisis por CCF de alta resolución, y a diferencia de los análisis por CCF, se utilizaron 2 fases móviles de distinta polaridad y 2 reactivos de derivatización. La finalidad de utilizar 2 fases móviles fue dar cuenta del perfil de

compuestos polifenólicos utilizando la fase móvil (1) y poder observar la presencia de metabolitos secundarios de menor polaridad en los extractos a través del uso de la fase móvil (2). En el caso de los reactivos de derivatización, se utilizó como derivatizador el reactivo p-anisaldehído sulfúrico (pAS), debido a que la derivatización de las placas con este reactivo nos permite obtener información respecto a la presencia de compuestos de menor polaridad, mientras que el reactivo NP es específico para el análisis de compuestos polifenólicos. Así, el análisis por CCF de alta resolución nos permitió dar cuenta de la diversidad de compuestos químicos presentes en los extractos obtenidos desde los frutos de murtila.

De acuerdo con los resultados obtenidos se pudo dar cuenta que existen diferencias cualitativas y cuantitativas entre los EACs y EEAs, las que se reflejan en la presencia e intensidad de bandas en los cromatogramas. En los EACs hay un mayor número de bandas y también estas poseen una mayor intensidad en comparación con las bandas que se obtuvieron en el análisis de los EEAs. Estos resultados se correlacionarían con los resultados obtenidos a través de la técnica de Folin-Ciocalteu, en el que los EACs exhibieron un mayor contenido fenólico que los EEAs (**Figura 12**). Además, las coloraciones presentes en la placa desarrollada con la fase móvil (1) y derivatizada con el reactivo NP (**Figura 18**) son similares a las que se observaron en el análisis por CCF (**Figuras 14 y 15**), lo que daría cuenta de la presencia de compuestos del tipo flavonoide, entre los que destacan flavonoles y sus derivados glicosilados. Por otro lado, si comparamos las diferencias detectadas en los cromatogramas entre los EACs de los distintos genotipos, estas podrían estar más relacionadas a diferencias en la concentración de los metabolitos secundarios y no a la presencia de uno o más compuestos específicos que pudieran representar un marcador químico de un genotipo en particular. Lo mismo se pudo concluir respecto a las diferencias entre los EETs.

Al analizar la placa desarrollada con la fase móvil (2) y derivatizada con el reactivo pAS, se pudo observar la presencia de bandas que, de acuerdo con su coloración bajo luz UV (366 nm), podrían corresponder a saponinas triterpénicas (Wagner & Bladt, 1996). Este tipo de compuestos han sido descritos como componentes importantes en las hojas de murtila y sus propiedades antiinflamatorias han sido investigadas (Aguirre, Delporte, Backhouse, Erazo, Letelier, Cassels, Silva, Alegria, & Negrete, 2006; Arancibia-Radich, Peña-Cerda, Jara, Valenzuela-Bustamante, Goity, Valenzuela-Barra, Silva, Garrido,

Delporte, & Seguel, 2016; Goity, Queupil, Jara-Moreno, Alegría, Peña-Cerda, Barriga, Aguirre, & Delporte, 2013; López, Vega-Gálvez, Rodríguez, Uribe, & Bilbao-Sainz, 2018), sin embargo, su presencia en frutos no ha sido reportada (López, Vega-Gálvez, Rodríguez, Uribe, & Bilbao-Sainz, 2018). La presencia de estos tipos de compuestos se observó principalmente en los EACs (**Figura 19**). Sin embargo, también fue posible observar señales débiles que podrían corresponder a triterpenos en los EEAs (**Figura 19C**). Estas diferencias en la composición química de los extractos de frutos de murtila podrían reflejarse en diferencias en sus propiedades farmacológicas. Al igual que en el caso de las antocianinas, las diferencias observadas en la presencia de los compuestos triterpénicos podrían deberse principalmente a la metodología de extracción sucesiva y exhaustiva utilizada, ya que la polaridad de acetona y etanol son similares.

A partir de las imágenes obtenidas de las placas de CCF de alta resolución se obtuvieron matrices numéricas que corresponden a las intensidades de las bandas observadas para cada una de las muestras analizadas. Estos datos fueron analizados por un PCA para así explorar la variabilidad química de los extractos de frutos de murtila de una manera más objetiva. En general, en los gráficos obtenidos a partir del PCA, podemos observar que las muestras se agrupan en 2 grupos en el eje del PC1 (**Figuras 20, 21 y 22**). Estos grupos corresponden a los EACs por un lado y a los EEAs por otro, confirmando que ambos sets de extractos presentan diferencias en sus composiciones químicas. Al analizar más detalladamente, es posible observar que existen diferencias en los gráficos que se obtuvieron a partir de los datos de las CCF de alta resolución desarrolladas con la fase móvil (1) (**Figuras 20 y 21**). Estas diferencias se deben a la utilización de diferentes reactivos de derivatización. La derivatización con el reactivo pAS es menos específica, lo que quiere decir que este reactivo nos permite la detección de un mayor número de metabolitos secundarios y no solo de compuestos fenólicos en los extractos analizados (Wagner & Bladt, 1996). Por otro lado, el reactivo NP nos permite detectar de manera específica compuestos fenólicos. Así, luego de la derivatización con el reactivo pAS, pudimos observar una mayor diferencia entre los EEAs, lo que se refleja en su separación en el eje del PC2 (**Figura 20**), mientras que luego de derivatizar con el reactivo NP se puede observar una mayor variabilidad entre los genotipos de los EACs (**Figura 21**).

En el análisis por PCA de los metabolitos secundarios de menor polaridad (**Figura 22**) también es posible observar 2 grupos que se separan en el eje del PC1 y que corresponden a los EACs y EEAs. Sin embargo, la variabilidad entre los genotipos estudiados pareciera ser menor, lo que se ve reflejado en la poca separación que existe entre las muestras de cada grupo de extractos en el eje del PC2. En el caso de los EEAs, la separación entre los genotipos es casi nula, lo que podría deberse a la baja presencia de compuestos de menor polaridad en estas muestras, lo que se puede determinar por la menor presencia de bandas y también menor intensidad de éstas luego de desarrollar la CCF de alta resolución con la fase móvil 2 y derivatizar con pAS (**Figura 19**). Cabe destacar que los EACs de los genotipos 27-1 y 19-1 y el EEA del genotipo 14-4 se encuentran agrupados en el gráfico presentado en la **Figura 22**, lo que reflejaría que la composición de compuestos menos polares en estos extractos es similar. Sin embargo, las diferencias entre los EEAs y EACs respecto de su composición de metabolitos secundarios de menor polaridad son claras en términos de la intensidad de la coloración de las bandas obtenidas con la CCF de alta resolución (**Figura 19**), y por lo tanto es posible afirmar que los EACs presentan una mayor concentración de este tipo de compuestos.

2.4 Análisis por CLAE-DAD de los extractos obtenidos a partir de distintos genotipos de murtila

Continuando con el análisis del perfil químico de los EACs y EEAs, se llevó a cabo un análisis por CLAE-DAD. El detector DAD nos permitió trabajar en un amplio rango de longitudes de onda (200 – 600 nm), pudiendo realizar un análisis más preciso de la composición química de los extractos de interés. Así, el análisis se llevó a cabo a 280 nm para observar el perfil de compuestos polifenólicos en general, a 360 nm para observar el perfil de compuestos del tipo flavonoides, y a 520 nm para analizar la presencia de antocianinas. Si bien el perfil de los compuestos polifenólicos en los EACs y EEAs resultó ser similar, las absorbancias de los picos presentes en los cromatogramas de cada grupo de extractos si presentan diferencias, siendo la absorbancia de los picos de los EACs alrededor de 3 veces mayores a las de los EEAs (**Anexo III**). Debido a que la absorbancia de cada pico o compuesto es proporcional a la concentración de éstos en la muestra, podríamos determinar que la concentración de los

polifenoles es mayor en los EACs que en los EEAs, resultados que tendrían relación con lo observado tanto para el CFT, como para lo observado en el análisis por CCF y CCFAR.

Además, el uso de patrones de referencia (**Tabla 9 y Figura 23**) nos permitió realizar la comparación de los tiempos de retención y máximos de absorbancia para señalar, tentativamente, la presencia de diversos compuestos polifenólicos. Así, se pudo identificar la presencia tentativa de ácido cafeico, rutina, miricetina, quercetina y canferol tanto en los EACs como en los EEAs, los cuales presentaron perfiles similares en relación con la presencia de los compuestos señalados (**Tablas 10 y 11**). Estos resultados están en concordancia con los resultados obtenidos a través del análisis por CCF y CCF de alta resolución, donde con el uso del reactivo NP como derivatizante se pudo identificar la presencia tentativa de flavonoles y sus derivados glicosilados, tales como la quercetina, rutina y miricetina (bandas anaranjado-amarillas) o el canferol (bandas amarillo-verdosas) (**Figuras 16 y 18**). También se pudo establecer la presencia de antocianinas en los EACs y EEAs a través del análisis por CLAE-DAD. Sin embargo, en comparación con otros compuestos fenólicos, el número de antocianinas presentes en los EACs y EEAs pareciera ser significativamente menor (**Figuras 24 C y 25 C**). Como ya se observó en el análisis por CCF (**Figura 14A**) y CCF de alta resolución (**Figura 18A**), a partir del análisis por CLAE-DAD se pudo determinar que las antocianinas se presentan principalmente en los EACs, reforzando la idea de que estos metabolitos se concentraron en el extracto obtenido con acetona debido a que este solvente fue utilizado previo a la extracción con etanol acidificado (EEAs).

En conjunto, los análisis realizados para dar cuenta del perfil químico de los extractos obtenidos a partir de los frutos distintos genotipos de murtilla, nos han permitido determinar que, en general, los EACs y EEAs presentan una composición de compuestos polifenólicos que es similar. Sin embargo, se observaron indicios de que las diferencias entre ambos grupos de extractos podrían estar en la concentración de los polifenoles, lo que se reflejó en los valores de CFT, la intensidad de las bandas en el análisis por CCF y CCF de alta resolución, y en las absorbancias de los picos obtenidos a partir del análisis por CLAE-DAD. Además, también se pudo dar cuenta de las diferencias que existen en la composición química de cada genotipo estudiado, dando cuenta de la influencia que puede tener el genotipo sobre la composición química de una especie vegetal.

3. Análisis del efecto de los extractos obtenidos de frutos de distintos genotipos de murtila sobre la agregación proteica

Para poder llevar a cabo el análisis de los efectos de los extractos de murtila sobre la agregación proteica se utilizó un modelo celular en el cual se sobreexpresó de manera transiente un péptido que consiste en 79 repeticiones de glutamina fusionado a EGFP (polyQ₇₉-EGFP). Este péptido puede agregarse formando inclusiones intracelulares que pueden ser detectadas y cuantificadas a través de microscopia de fluorescencia. Esta expansión de glutaminas ha sido relacionada al desarrollo de una serie de enfermedades que en conjunto se han denominado poliglutaminopatías (Adegbuyiro, Sedighi, Pilkington, Groover, & Legleiter, 2017). Un ejemplo de este tipo de patologías corresponde a la EH, en donde una expansión de glutaminas en la proteína HTT provoca la formación de agregados del tipo amiloide que son tóxicos para las neuronas medianas espinosas del cuerpo estriado del cerebro. La formación de inclusiones de polyQ₇₉-EGFP fue analizada utilizando la plataforma de microscopia de fluorescencia automatizada *Arrayscan XTI* de *cellomics*. Esta plataforma automatizada posee tanto control de temperatura como de niveles de CO₂, permitiendo la visualización y cuantificación de componentes celulares *in situ* en células vivas. Esto, sumado a la utilización de reporteros fluorescentes, permite el análisis de diversos parámetros tales como disfunción mitocondrial, acumulación de ROS o formación de agregados proteicos, lo que representa una ventaja tanto para el descubrimiento de nuevos fármacos, como para la investigación biomédica básica (Iannetti, Prigione, Smeitink, Koopman, Beyrath, & Renkema, 2019; Taylor, 2007). La plataforma *Arrayscan XTI* tiene la capacidad de analizar hasta 3 reporteros fluorescentes de forma simultánea. Esta característica nos permitió analizar el número de células con la tinción nuclear Hoescht 3342 (canal azul) y, en paralelo, la formación de inclusiones EGFP (+) (canal verde) o el número de células muertas utilizando la tinción 7-AAD (canal rojo).

Previo al análisis de la citotoxicidad de los extractos y de sus efectos sobre la agregación de polyQ₇₉-EGFP, se realizó el análisis de un parámetro estadístico denominado factor Z' para determinar la idoneidad del modelo de agregación de polyQ₇₉-EGFP para ser utilizado en la plataforma *Arrayscan XTI*. El factor Z' es un valor adimensional que puede adoptar valores entre -1,0 y 1,0 siendo sus valores óptimos entre 0,5 y 1,0. Este factor es representativo de la calidad del modelo y puede ser utilizado para la optimización del

ensayo (J. Zhang, Chung, & Oldenburg, 1999). Con la finalidad de determinar las condiciones óptimas para llevar a cabo el análisis de agregación de polyQ₇₉-EGFP, se transfectaron las células con distintas cantidades del plasmidio que codifica para el péptido de interés, realizando el análisis en la plataforma *Arraysan XTI* luego de 24 y 48 h de transfección. De acuerdo con los resultados obtenidos, utilizando 5 µg del plasmidio que codifica para el péptido polyQ₇₉-EGFP se observaron valores de factor Z' por sobre 0,5 (**Figura 28**), valores que además fueron reproducibles en experimentos independientes (**Figura 29**). Por lo tanto, esta metodología es apta para llevar a cabo el análisis de la capacidad de los EACs y EEAs de disminuir el número de inclusiones de polyQ₇₉-EGFP. Cabe destacar que la formación de inclusiones de polyQ₇₉-EGFP es bastante agresiva, lo que se refleja en el aumento del número de inclusiones entre las 24 y 48 h post transfección, que va desde 0,2 a alrededor de 1,0 inclusión por célula transfectada (**Figura 29B**). Sin embargo, este aumento agresivo del número de inclusiones no pareciera tener un efecto tóxico sobre las células HEK293 (**Figura 29A**), lo que supone una ventaja para el estudio de los efectos de los extractos de murtila sobre la formación de inclusiones intracelulares de polyQ₇₉-EGFP al permitir estudiar los efectos de los extractos en un rango más amplio de tiempo.

Posteriormente se analizó la toxicidad de los extractos de murtila en las células HEK293, lo que representa un paso clave en el descubrimiento, estudio y desarrollo de nuevos fármacos. Luego de 24 h de tratamiento, se observó que los EACs presentaron una toxicidad mayor que los EEAs, toxicidad que alcanzó valores cercanos al 100% a las mayores concentraciones utilizadas (**Figura 30**). Si bien no se observó una relación entre el CFT de los extractos y su toxicidad celular en células HEK293 (**Figura 31**), es importante destacar que los EACs presentan, en general, un CFT que es alrededor de 3 veces mayor que el de los EEAs (**Figura 12**), además de presentar una mayor presencia de compuestos de menor polaridad, como triterpenoides (**Figura 20**). La presencia de este tipo de compuestos podría dar cuenta, en parte, de la mayor citotoxicidad de estos extractos (Chudzik, Korzonek-Szlacheta, & Krol, 2015). La mayor concentración de compuestos fenólicos en los EACs es otro antecedente importante considerar, ya que se ha reportado que los polifenoles pueden actuar como agentes pro-oxidantes a altas concentraciones, promoviendo la muerte celular a través de la activación de la apoptosis (D'Angelo, Martino, Ilisso, Bagarolo, Porcelli, & Cacciapuoti, 2017; Eghbaliferiz &

Iranshahi, 2016; Leon-Gonzalez, Auger, & Schini-Kerth, 2015), lo que podría explicar la mayor toxicidad de los EACs en comparación a los EEAs.

Considerando los resultados obtenidos, se ajustaron los rangos de concentración de los EACs y EEAs para llevar a cabo el análisis del efecto sobre el número de inclusiones de polyQ₇₉-EGFP. El tratamiento con los extractos se realizó 4 h luego de la transfección con el plasmidio que codifica para el péptido polyQ₇₉-EGFP y el análisis de las inclusiones EGFP (+) se llevó a cabo 24 y 48 h después del tratamiento. Por lo tanto, se analizó el efecto que podrían tener los extractos tanto de inhibir la formación de inclusiones intracelulares, como la de desagregar agregados preformados. De acuerdo con los resultados obtenidos, el tratamiento con los EACs a las concentraciones ajustadas no provocó cambios significativos en el número de inclusiones intracelulares de polyQ₇₉-EGFP a los tiempos analizados (24 y 48 h) (**Figura 32**). Por otro lado, el tratamiento con 5 EEAs (Gs 14-4, 19-1, 19-1ha, 23-2 y 27-1) a una concentración de 100 µg/mL provocó una disminución significativa ($p < 0,05$) del número de inclusiones de polyQ₇₉-EGFP luego de 24 h, efecto que no se observó a las 48 h (**Figura 33**). Esto podría deberse a que la capacidad de los compuestos presentes en estos extractos para reducir el número de agregados de polyQ₇₉-EGFP se ve mermada por la continua expresión del péptido y formación de inclusiones. Como ya ha sido mencionado, el perfil de compuestos polifenólicos de los EACs y EEAs es más bien similar, sin embargo, los extractos EACs resultaron ser más citotóxicos en comparación a los EEAs. Por esta razón, el análisis de los efectos de los EACs sobre la formación de inclusiones de polyQ₇₉-EGFP se realizó a menores concentraciones, lo que en parte podría explicar que no se vean efectos luego del tratamiento con estos extractos.

Considerando los resultados previos en los cuales se analizó comparativamente la composición química de los extractos de murtilla, donde se observó que estos extractos poseen una gran variedad de compuestos polifenólicos, se podría inferir que los efectos observados sobre el número de inclusiones de polyQ₇₉-EGFP podrían deberse a la capacidad de los diferentes compuestos presentes en los extractos de disminuir el número de inclusiones proteicas. Respecto a la relación con la concentración de compuestos fenólicos de estos 5 extractos, el que presentó un mayor CFT fue el EEA 23-2 ($30,0 \pm 2,0$ mg EAG/g ES) (**Tabla 8 y Figura 11**), que presentó la menor disminución en el número de inclusiones de polyQ₇₉-EGFP (20,9%) (**Figura 33A**). Además, el EEA

14-4 fue el que presentó el menor CFT ($20,3 \pm 1,2$ mg EAG/g ES) no solo entre los 5 que redujeron el número de inclusiones EGFP (+), sino que entre todos los extractos analizados (**Tabla 8 y Figura 11**). Sin embargo, presentó uno de los mayores efectos sobre el número de inclusiones de polyQ₇₉-EGFP, con un 23,9% de disminución. Por lo tanto, no existe una relación directa entre el CFT calculado por la técnica de Folin y los efectos de los extractos sobre el número de inclusiones intracelulares de polyQ₇₉-EGFP. Por otro lado, también se analizaron los efectos del tratamiento con los EEAs sobre la distribución del péptido polyQ₇₉-EGFP en las células tratadas, observando que el tratamiento con los EEAs no afecta el porcentaje de células EGFP (+) respecto al control a ninguna de las concentraciones utilizadas (**Figura 34**).

Para confirmar los resultados obtenidos por microscopía de fluorescencia en la plataforma *Arrayscan XTI* se llevó a cabo un análisis de los efectos de los extractos seleccionados sobre la formación de EAPM de polyQ₇₉-EGFP y mHTT_{Q85}-GFP a través de la técnica de *Western blot*. Además, se analizó el efecto del tratamiento con los extractos seleccionados sobre los niveles del péptido control polyQ₁₁-GFP, péptido que al sobre-expresarse no forma inclusiones proteicas y por lo tanto representa un modelo no patogénico de expresión de polyQ. Para el análisis del efecto sobre los niveles de las EAPM de mHTT_{Q85}-GFP, las células HEK293 fueron transfectadas con un vector que expresa la región amino-terminal de proteína HTT que contiene los primeros 171 aminoácidos de su secuencia (exón 1), con 85 repeticiones de glutamina y acoplada a GFP. Este péptido corresponde a uno de los fragmentos proteicos patogénicos descrito en la enfermedad de Huntington (EH), por lo que recapitula de manera más fidedigna el fenómeno de la agregación proteica que ocurre en el cerebro de los pacientes con la EH.

De acuerdo con los resultados obtenidos, solo el tratamiento con el EEA 19-1 redujo los niveles de las EAPM de polyQ₇₉-EGFP de manera significativa ($p < 0,05$) (**Figura 35**), confirmando los efectos observados previamente en el análisis por microscopía de fluorescencia. Sin embargo, también se observó una disminución significativa ($p < 0,05$) en los niveles de los monómeros de polyQ₇₉-EGFP luego del tratamiento con el EEA 19-1 (**Figura 35C**) y, por lo tanto, la disminución de las EAPM podría explicarse por el efecto que el extracto tendría sobre la expresión del péptido. Respecto a los niveles de las EAPM del péptido mHTT_{Q85}-GFP, el tratamiento con los EEAs 19-1, 23-2, y 27-1 redujo los niveles de las EAPM del péptido mHTT_{Q85}-GFP, pero esta disminución solo fue

estadísticamente significativa con el tratamiento del EEA 19-1 (**Figura 36**). Cabe destacar que los efectos sobre las EAPM de los péptidos polyQ₇₉-EGFP y mHTT_{Q85}-GFP solo se analizaron a una concentración de los extractos seleccionados (100 µg/mL) y a un tiempo de tratamiento (16 h), por lo que no se podría descartar que, al realizar el análisis a una mayor concentración, o por un mayor tiempo, se observen resultados que sean estadísticamente significativos luego del tratamiento con los demás extractos seleccionados. Además, el tratamiento con los extractos seleccionados no produjo cambios significativos sobre los niveles del péptido polyQ₁₁-EGFP (**Figura 37**). Estos resultados nos permiten inferir, primero, que los efectos del tratamiento con los extractos seleccionados no son necesariamente específicos por las las EAPM de polyQ₇₉-EGFP, sino que también podrían tener potencial en el estudio de la agregación de proteínas asociadas a la aparición y desarrollo de otras enfermedades neurodegenerativas y, segundo, que los efectos de los extractos seleccionados, y en específico del EEA 19-1, estarían asociados a la presencia de agregados u oligómeros proteicos, ya que no se observaron cambios significativos sobre los niveles de polyQ₁₁-EGFP luego del tratamiento con los ESeI.

Por lo tanto, el EEA 19-1, genotipo que corresponde a una variedad comercial inscrita por el INIA denominada Red Pearl, se posiciona como un candidato para realizar estudios posteriores en los que se analice su potencial neuroprotector en modelos de EH u otras proteinopatías, ya que no solo se observaron efectos sobre el número de inclusiones de polyQ₇₉-EGFP por microscopia de fluorescencia luego del tratamiento con este extracto, sino que también se observó que el tratamiento redujo los niveles de las EAPM de polyQ₇₉-EGFP y los niveles de las EAPM de mHTT_{Q85}-EGFP a través de la técnica de *Western blot*.

Debido a la baja toxicidad presentada por los EEAs, además de la presencia de diversos compuestos polifenólicos en estos extractos, es posible considerar el uso de éstos para el desarrollo de productos nutracéuticos. Un nutracéutico corresponde a un suplemento dietario que apunta a complementar la dieta de los consumidores con una fórmula concentrada de los componentes activos de los alimentos. Esto se logra a través de su formulación en una matriz no alimenticia, cuya finalidad es la de prevenir o tratar una enfermedad (Santini, Cammarata, Capone, Ianaro, Tenore, Pani, & Novellino, 2018). En el caso específico del tratamiento con el EEA 19-1, debido a sus efectos sobre la

agregación de polyQ₇₉ y mHTT_{Q85}, este extracto podría ser la materia prima para la formulación de un producto que podría ser utilizado en la prevención del desarrollo de enfermedades neurodegenerativas. Por supuesto, para lograr esto es primero necesario validar los resultados obtenidos en modelos *in vivo* de neurodegeneración y estudiar la biodisponibilidad de los compuestos presentes en el extracto que sean responsables de los efectos observados.

4. Identificación de compuestos polifenólicos en los extractos seleccionados

Para dar cuenta de la composición química de los extractos seleccionados y complementar los resultados obtenidos previamente por CCF, CCF de alta resolución y CLAE-DAD, se realizó un análisis por cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas (CLAE-ESI-UV-EM/EM). Los resultados obtenidos en este análisis se corresponden con los resultados obtenidos por diferentes grupos de investigación que en los últimos años han analizado el perfil químico de los frutos de murtila. En estos estudios se observó que los extractos polares de estos frutos presentan principalmente derivados glicosilados de flavonoles como quercetina, miricetina y canferol, además de sus respectivas geninas; distintos derivados de ácidos fenólicos tales como ácido cafeico, ácido benzoico y ácido gálico y diferentes antocianinas, principalmente derivados 3-O-glucosilados de cianidina y peonidina. Además se han identificado flavan-3-oles tales como catequina y epicatequina (Alfaro, Mutis, Palma, Quiroz, Seguel, & Scheuermann, 2013; Augusto, Salinas, Alencar, D'Arce, Camargo, & Vieira, 2014; Brito, Areche, Sepulveda, Kennelly, & Simirgiotis, 2014; Junqueira-Goncalves, Yanez, Morales, Navarro, R, & Zuniga, 2015; Lopez de Dicastillo, Bustos, Valenzuela, Lopez-Carballo, Vilarino, & Galotto, 2017; Ramirez, Zambrano, Sepulveda, Kennelly, & Simirgiotis, 2015; Ruiz, Hermosin-Gutierrez, Mardones, Vergara, Herlitz, Vega, Dorau, Winterhalter, & von Baer, 2010; Shene, Reyes, Villarroel, Sineiro, Pinelo, & Rubilar, 2008). Al analizar los tiempos de retención (Tr) y patrones de fragmentación de los compuestos tentativamente identificados, se pudo dar cuenta de 6 picos cuyos Tr y patrones de fragmentación coincidían en los 5 extractos seleccionados. Dentro de estos 6 compuestos destaca la presencia de derivados de ácido cafeico y ácido quínico, además de derivados glicosilados de miricetina y quercetina, y la quercetina libre (**Tabla 12 y Figura 39**). La presencia de este flavonol en los extractos seleccionados se pudo

confirmar con los resultados obtenidos en el análisis por CLAE-DAD, donde el patrón de quercetina presentó un $T_r \sim 31,5$ y máximos de absorción a 255 y 370 nm (**Figura 25 y Tabla 11**), además de la presencia de los fragmentos de $m/z \sim 178$ y $m/z \sim 151$ que son característicos de la fragmentación del flavonol quercetina (Fabre, Rustan, de Hoffmann, & Quetin-Leclercq, 2001). Además, a través de este análisis se pudo dar cuenta de aquellos compuestos que se encuentran en una mayor concentración relativa en el EEA 19-1 y de 11 compuestos que solo están presentes en este extracto (**Tabla 14**).

Respecto a la presencia de antocianinas en los extractos seleccionados, los resultados obtenidos se correlacionan con lo observado en el análisis por CCF (**Figura 15**), CCF de alta resolución (**Figura 18**), y CLAE-DAD (**Figura 25**), ya que se observan solo 2 a 3 picos correspondientes a antocianinas, los que además presentan una baja intensidad (**Figura 40**). Las antocianinas tentativamente identificadas en este análisis corresponden a derivados de cianidina y peonidina, lo que se correlaciona a los resultados obtenidos por otros grupos de investigación. En el 2015, Ramírez *et al* analizaron la composición química de un extracto polar de frutos maduros de murtila silvestre, identificando 5 antocianinas, de las cuales las más importantes correspondieron a derivados 3-O-glicosilados de petunidina y peonidina (Ramírez, Zambrano, Sepulveda, Kennelly, & Simirgiotis, 2015). En el trabajo de Junqueira-Gonçalves *et al* (2015), se analizó la presencia de antocianinas en frutos maduros correspondientes al genotipo 14-4 del banco de germoplasmas del INIA, Carillanca. 10 antocianinas fueron identificadas en estos frutos, de las cuales las principales correspondieron a derivados de glucosa y arabinosa de delfinidina, petunidina y cianidina (Junqueira-Gonçalves *et al.*, 2015). Cabe destacar que los 5 extractos seleccionados corresponden a extractos obtenidos con etanol acidificado con 1% de ácido fórmico. Sin embargo, previo a la utilización de este solvente, el material vegetal fue extraído exhaustivamente con acetona, por lo que las antocianinas podrían estar concentradas en los EACs y no en los EEAs. Esto, como ya ha sido comentado, se puede inferir de los resultados obtenidos por CCF (**Figuras 14 y 15**), CCF de alta resolución (**Figura 18**) y CLAE-DAD (**Figuras 24 y 25**).

Si bien se pudo dar cuenta de que existen diferencias en la composición química de los distintos genotipos de murtila, el perfil de compuestos fenólicos es más bien similar entre los extractos. Esto podría significar que la influencia del genotipo sobre la composición química de los frutos de murtila podría tener más relación con la

concentración en la que estos compuestos son sintetizados por estos frutos, más que con la presencia de uno o más compuestos que pudieran ser seleccionados como marcadores químicos para la diferenciación de los genotipos de *Ugni molinae*.

Considerando los resultados obtenidos por la técnica de CLAE-UV-ESI-EM/EM (**Figuras 38, 39, y 40**), además de las observaciones realizadas a través de CCF (**Figuras 14 y 15**), CCF de alta resolución (**Figuras 17, 18, y 19**), y CLAE-DAD (**Tablas 10 y 11**), el efecto de los extractos seleccionados, y más específicamente del EEA 19-1, de disminuir el número de agregados proteicos se podría explicar por la presencia de diversos compuestos de naturaleza polifenólica en ellos. Los compuestos polifenólicos han demostrado la capacidad de interferir directamente en el proceso de agregación y de combatir la toxicidad de diversas proteínas relacionadas al desarrollo de enfermedades neurodegenerativas, siendo los compuestos polifenólicos más estudiados el resveratrol (RESV), la curcumina (CUR) y la epigallocatequina galato (EGCG) (Das, Stark, Musgrave, Pukala, & Smid, 2016; Porzoor, Alford, Hugel, Grando, Caine, & Macreadie, 2015; Stefani & Rigacci, 2013). También se han estudiado compuestos de la familia de los flavonoides como la quercetina, miricetina, canferol, luteolina y fisetina, compuestos que de acuerdo con los análisis realizados por CCF (**Figuras 14 y 15**) y CLAE-DAD (**Tablas 10 y 11**), podrían estar presentes tanto en los EACs como en los EEAs. Estos compuestos han demostrado su capacidad de inhibir directamente la agregación de proteínas en experimentos *in vitro*, donde se ha concluido que la presencia de grupos hidroxilos en el anillo B del esqueleto de los flavonoides (**Figura 41**) sería esencial para la formación de enlaces covalentes con residuos de aminoácidos claves en el proceso de formación de los agregados proteicos amiloides (Andarzi Gargari, Barzegar, & Tarinejad, 2018; Das, Stark, Musgrave, Pukala, & Smid, 2016; Hanaki, Murakami, Akagi, & Irie, 2016; Marsh, Das, Ridell, & Smid, 2017; Ono, Li, Takamura, Yoshiike, Zhu, Han, Mao, Ikeda, Takasaki, Nishijo, Takashima, Teplow, Zagorski, & Yamada, 2012; Ono & Yamada, 2006; Ono, Yoshiike, Takashima, Hasegawa, Naiki, & Yamada, 2003).

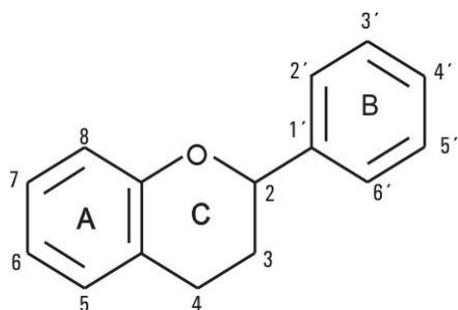


Figura 41. Estructura básica de los flavonoides. Los flavonoides presentan una estructura con 3 anillos (A, B y C). En la Figura se presenta la numeración de la estructura básica de los flavonoides

Además, también se ha demostrado que el tratamiento con este tipo de compuestos podría tener efectos neuroprotectores frente a la toxicidad de diversos agregados proteicos. Un ejemplo de esto es el estudio llevado a cabo por Wang et al. (2012), donde se demostró que la rutina, un derivado glicosilado de quercetina, además de su capacidad de inhibir la formación de agregados de A β *in vitro*, reduce la toxicidad mediada por el péptido A β -42 en células SH-SY5Y debido a sus propiedades antioxidantes (Wang, Wang, Su, Zhou, Yang, Zhang, Zhao, Li, Zhang, Zhan, & Liu, 2012). Otro ejemplo corresponde al estudio llevado a cabo por Liu et al. (2011), quienes estudiaron los efectos neuroprotectores de la luteolina aislada desde la planta *Elsholtzia rugulosa* sobre un modelo celular de la enfermedad de Alzheimer inducida por cobre, observando que tratamientos a concentraciones del orden de los μ M de este flavonoide provocaban un aumento de la viabilidad celular (Liu, Meng, Zhang, Liu, Qin, Lan, Li, & Du, 2011). La miricetina, cuyos derivados glicosilados han sido identificados en los extractos de murtilla seleccionados, es capaz de revertir la toxicidad celular de agregados de polyQ al inhibir su agregación, además de revertir la disfunción motora en un modelo farmacológico de la EH (Khan, Tawani, Mishra, Verma, Upadhyay, Kumar, Sandhir, Mishra, & Kumar, 2018). Compuestos con estructuras similares a la miricetina también inhiben potentemente la formación de inclusiones de polyQ en modelos celulares y en células obtenidas de pacientes con EH (Khan, Biswas, Mishra, Mishra, Samanta, Mishra, Tawani, & Kumar, 2019). También se ha observado que el efecto de miricetina sobre la agregación intracelular de polyQ, SOD1, y α Syn se podría explicar por la inducción de la expresión de chaperonas y la activación del sistema ubiquitina-

proteosoma (V. Joshi, Mishra, Upadhyay, Amanullah, Poluri, Singh, Kumar, & Mishra, 2019).

Por otro lado, también se ha demostrado el efecto que podrían tener extractos ricos en compuestos polifenólicos sobre la agregación proteica. Por ejemplo, Ueda et al. (2017) utilizaron un extracto de propóleo verde rico en ácidos fenólicos y flavonoides como tratamiento en un modelo celular de ELA, observando una disminución de los agregados de la proteína SOD1 mutante (Ueda, Inden, Shirai, Sekine, Masaki, Kurita, Ichihara, Inuzuka, & Hozumi, 2017). También analizaron el efecto de canferol, componente identificado en el extracto de propóleo verde y tentativamente identificado en los ESeI del presente estudio, sobre la agregación de la SOD1 mutante, observando que el tratamiento con este compuesto también provoca la disminución de los agregados de la SOD1 mutante de manera concentración-dependiente mediante la activación de autofagia (Ueda et al, 2017). Otros estudios también han demostrado la capacidad de los compuestos polifenólicos de modular ciertas vías de señalización relacionadas a la degradación de proteínas, tales como la autofagia. Una revisión de Nabavi et al. (2018) analiza la importancia de la autofagia en el contexto de los desórdenes de agregación proteica y el potencial terapéutico de 23 compuestos polifenólicos, entre los que destacan quercetina, canferol, miricetina, algunas catequinas y resveratrol, los que han demostrado la capacidad de modular la actividad autofágica para promover la remoción de agregados proteicos aberrantes (Nabavi, Sureda, Dehpour, Shirooie, Silva, Devi, Ahmed, Ishaq, Hashim, Sobarzo-Sanchez, Daglia, Braidy, Volpicella, Vacca, & Nabavi, 2018). En el caso específico de canferol, Filomeni et al (2012) demostraron que el tratamiento con este compuesto pudo proteger a células SH-SY5Y y cultivos primarios de células corticales de la toxicidad inducida por rotenona. Esto podría ser explicado por la capacidad del canferol contrarrestar la producción de especies reactivas del oxígeno (ROS) mediada por la rotenona, además de aumentar los niveles de LC3-II e inducir la formación de autofagosomas (Filomeni, Graziani, De Zio, Dini, Centonze, Rotilio, & Ciriolo, 2012). Por otro lado, Regitz et al. (2014) observaron que el tratamiento con quercetina en un modelo transgénico de *C. elegans* que expresa el péptido A β ₁₋₄₂, provocó una activación de la autofagia y de vías de degradación proteasomal, lo que se reflejó en una reducción en los niveles de proteínas agregadas y en una reversión de la parálisis en los nemátodos transgénicos (Regitz, Dussling, & Wenzel, 2014). Además, algunos compuestos polifenólicos que han demostrado modular la actividad del sistema

ubiquitina-proteosoma, como curcumina y resveratrol, han llegado a ser parte de intervenciones en humanos para dar cuenta de su seguridad y eficacia en el tratamiento de diversas enfermedades neurodegenerativas (Momtaz, Memariani, El-Senduny, Sanadgol, Golab, Katebi, Abdolghaffari, Farzaei, & Abdollahi, 2020).

Nuestro laboratorio ha analizado el efecto de un extracto rico en polifenoles obtenido a partir de las hojas de murtila silvestre sobre los agregados del péptido A β , observando que dicho extracto inhibe la agregación de este péptido *in vitro* y además desagrega agregados previamente formados (Jara-Moreno, Riveros, Barriga, Kogan, & Delporte, 2020). Además, este extracto mostró una tendencia a proteger un cultivo primario de neuronas hipocampales de los efectos tóxicos de los oligómeros del péptido A β (Jara-Moreno, Riveros, Barriga, Kogan, & Delporte, 2020). Desde el punto de vista de su perfil químico, este extracto es similar a los extractos de frutos de murtila analizados en este estudio, ya que presenta una gran cantidad de derivados glicosilados de flavonoles como la miricetina, quercetina y canferol, elagitaninos, y ácidos fenólicos (Jara-Moreno, Castro-Torres, Ettcheto, Auladell, Kogan, Folch, Verdaguer, Cano, Busquets, Delporte, & Camins, 2018; Jara-Moreno, Riveros, Barriga, Kogan, & Delporte, 2020).

También se han analizado los efectos del tratamiento con compuestos polifenólicos, o extractos ricos en este tipo de compuestos, en modelos *in vivo* que recapitulan el desarrollo de diversas enfermedades neurodegenerativas. Por ejemplo, el tratamiento con quercetina fue capaz de mejorar aspectos motores y conductuales en un modelo de ratas con EH inducida por administración sistémica de ácido 3-nitropropiónico (Chakraborty, Singh, Dutta, Naskar, Rajamma, & Mohanakumar, 2014). Este modelo recapitula los daños en las zonas estriatales y corticales provocando problemas motores y cognitivos similares a aquellos observados en los pacientes con la EH (Brouillet, 2014). También, en nuestro laboratorio se ha demostrado que la administración de un extracto obtenido desde la hoja de *Ugni molinae* silvestre a un modelo murino preclínico de la EA es capaz de revertir los efectos deletéreos sobre su capacidad cognitiva. Esto estaría relacionado a la capacidad de los metabolitos secundarios presentes en el extracto de modular la neuroinflamación y de reducir el número y tamaño de los depósitos del péptido A β en la corteza e hipocampo de los ratones tratados (Jara-Moreno, Castro-Torres, Ettcheto, Auladell, Kogan, Folch, Verdaguer, Cano, Busquets, Delporte, & Camins, 2018).

Además de los efectos directos e indirectos sobre la agregación proteica de los polifenoles, un factor importante a considerar es la biodisponibilidad de estos compuestos en el cerebro luego de ser consumidos por vía oral. Dentro de los principales factores que afectan la biodisponibilidad de los compuestos polifenólicos podemos mencionar: (1) la interacción con otros compuestos, como aquellos presentes en la matriz del alimento o del extracto, o en el organismo, como la albúmina, (2) la estructura química y concentración del polifenol, y (3) factores intestinales, como la función de diversas enzimas, el tránsito intestinal, y la microflora del colon (D'Archivio, Filesi, Vari, Scazzocchio, & Masella, 2010). En general, luego de ser ingeridos por la vía oral, los compuestos polifenólicos llegan al intestino delgado, donde aquellos compuestos unidos a azúcares pueden ser hidrolizados por las enzimas lactasa-florozina hidrolaza (LPH) o la β -glucosidasa citosólica presente en las células epiteliales del intestino (Kawabata, Yoshioka, & Terao, 2019; Lewandowska, Szewczyk, Hrabec, Janecka, & Gorlach, 2013; Manach, Scalbert, Morand, Remesy, & Jimenez, 2004). Las geninas liberadas pueden ser absorbidas en el intestino delgado o sufrir metabolización y ser conjugadas con grupos glucurónidos o sulfatos (Kawabata, Yoshioka, & Terao, 2019; Lewandowska, Szewczyk, Hrabec, Janecka, & Gorlach, 2013; Manach, Scalbert, Morand, Remesy, & Jimenez, 2004). En ambos casos, estas moléculas serán transportadas al hígado, donde podrían ser nuevamente metabolizadas antes de llegar al torrente sanguíneo (Kawabata, Yoshioka, & Terao, 2019). Un estudio en humanos analizó la biodisponibilidad de diversos polifenoles luego del consumo a largo plazo de una mezcla de berries, observando que las concentraciones plásmaticas de flavonoles como la quercetina y ácidos fenólicos como el ácido cafeico, ácido protocatequico, ácido p-cumárico, y ácido vainillico, aumentaron significativamente en el grupo que consumió berries en comparación al grupo control (Koli, Erlund, Jula, Marniemi, Mattila, & Alfthan, 2010). De manera similar, el consumo agudo y repetitivo de una bebida de arándano provocó el aumento significativo, con respecto a los sujetos del grupo control, de las concentraciones plasmáticas de compuestos como canferol, quercetina, ácido cafeico, ácido ferúlico, ácido clorogénico, derivados de catecol, metabolitos conjugados de los compuestos mencionados, entre otros (Feliciano, Ista, Heiss, & Rodriguez-Mateos, 2016). En total, 61 metabolitos fueron detectados en el plasma de los sujetos que consumieron la bebida de arándano, de los cuales 19 aumentaron su concentración 2 h después de consumir

la bebida y 38 después de 1 mes de suplementación diaria (Feliciano, Iltas, Heiss, & Rodriguez-Mateos, 2016).

Considerando la evidencia respecto a la biodisponibilidad de los compuestos polifenólicos y los efectos neuroprotectores de este tipo de compuestos en modelos animales de enfermedades neurodegenerativas (Chakraborty, Singh, Dutta, Naskar, Rajamma, & Mohanakumar, 2014; Jara-Moreno, Castro-Torres, Ettcheto, Auladell, Kogan, Folch, Verdaguer, Cano, Busquets, Delporte, & Camins, 2018; Khan, Biswas, Mishra, Mishra, Samanta, Mishra, Tawani, & Kumar, 2019; Khan, Tawani, Mishra, Verma, Upadhyay, Kumar, Sandhir, Mishra, & Kumar, 2018) es posible considerar que los polifenoles son capaces de atravesar la barrera hematoencefálica para producir sus efectos directamente en el cerebro. Utilizando un modelo de endotelio microvascular de cerebro humano, se ha observado que diversos metabolitos de polifenoles son capaces de atravesar la barrera hematoencefálica, posiblemente a través de algún tipo de transporte activo (Figueira, Garcia, Pimpao, Terrasso, Costa, Almeida, Tavares, Pais, Pinto, Ventura, Filipe, McDougall, Stewart, Kim, Palmela, Brites, Brito, Brito, & Santos, 2017). Al mismo tiempo, en un estudio llevado a cabo en pacientes con esclerosis múltiple, se observó la presencia de ácidos fenólicos, como el ácido cafeico, en muestras de líquido cerebroespinal, lo que confirmaría que este tipo de moléculas son capaces de atravesar la barrera hematoencefálica (Grabska-Kobylecka, Kaczmarek-Bak, Figlus, Prymont-Przyminska, Zwolinska, Sarniak, Wlodarczyk, Glabinski, & Nowak, 2020). Además, no hubo una correlación entre los niveles plasmáticos de ácido cafeico y su concentración en el líquido cerebroespinal, lo que sugiere que el transporte del ácido cafeico a través de la barrera hematoencefálica no ocurriría a través de mecanismos de difusión pasiva o facilitada (Grabska-Kobylecka, Kaczmarek-Bak, Figlus, Prymont-Przyminska, Zwolinska, Sarniak, Wlodarczyk, Glabinski, & Nowak, 2020).

Por lo tanto, la disminución del número de inclusiones intracelulares de polyQ₇₉-EGFP y de los niveles de las EAPM de polyQ₇₉-EGFP y de mHTT_{Q85}-GFP luego del tratamiento con extractos obtenidos de frutos maduros de murtila podría deberse a la presencia de diversos compuestos polifenólicos que, por un lado, podrían interactuar directamente con proteínas mal plegadas evitando la formación de agregados tóxicos o desagregando agregados preformados, y por otro lado, podrían modular procesos involucrados en la degradación de proteínas, como la autofagia, para así disminuir la carga de proteínas

mal plegadas y agregados proteicos. Intersantemente, a pesar de las similitudes en el perfil polifenólico de los extractos analizados, solo el EEA 19-1 presento efectos significativos tanto sobre la agregación de polyQ₇₉, como de mHTT_{Q85}. Esto implicaría que, además, la proporción en la que los compuestos polifenólicos están presentes en el extracto también tendría influencia en sus efectos sobre la agregación proteica.

VII. CONCLUSIONES

De acuerdo con lo expuesto anteriormente, fue posible concluir que:

Los EEAs presentaron el mayor rendimiento de extracción, promediando alrededor de un 22%, mientras que los EAC y EDCM presentaron un rendimiento cercano al 2%. Esto demuestra que en los frutos de murtila predomina la presencia de compuestos de naturaleza polar, tales como flavonoides y otros compuestos fenólicos.

Se observaron diferencias significativas en el contenido fenólico tanto entre los EACs, como entre los EEAs. Sin embargo, en el análisis por CCF, CCF de alta resolución y CLAE-DAD se pudo observar que existen similitudes en el perfil de compuestos fenólicos presentes en los EACs y EEAs.

El tratamiento con los EACs generó una mayor citotoxicidad luego de 24 h de tratamiento respecto a los EEAs. Esto podría guardar relación con su mayor CFT en comparación a los EEAs, sin embargo, no se observó una relación directa entre el CFT y la citotoxicidad. Por lo tanto, la toxicidad celular de los EACs podría estar relacionada a la presencia de compuestos de menor polaridad, como triterpenoides), en estos extractos.

Sólo los EEAs de los genotipos 14-4, 19-1, 19-1ha, 23-2 y 27-1 presentaron el efecto de disminuir el número de inclusiones intracelulares de polyQ₇₉-EGFP a la mayor concentración analizada (100 µg/mL) y luego de 24 h de tratamiento. Estos resultados no tuvieron relación con los valores de Folin observados para los extractos seleccionados y por lo tanto no hay una relación entre la concentración de compuestos fenólicos de los extractos y sus efectos sobre la agregación de polyQ₇₉-EGFP.

Interesantemente, en la validación a través de la técnica de *Western blot*, solo el tratamiento con el EEA 19-1 (100 µg/mL), produjo una disminución significativa de las EAPM de polyQ₇₉-EGFP ($p < 0,01$) y de mHTT_{Q85}-GFP ($p > 0,05$), sin afectar los niveles del péptido polyQ₁₁-EGFP. Cabe resaltar que este genotipo corresponde a una variedad comercial inscrita por el INIA (Read Pearl) y que, a pesar de que su perfil de compuestos polifenólicos es similar al perfil de los otros extractos analizados, se identificaron 10 compuestos que solo están presentes en el EEA 19-1, entre los cuales destacan derivados glicosilados de quercetina y miricetina.

Considerando el perfil químico de los EEAs, se puede concluir que la presencia de compuestos polifenólicos en éstos tiene relación con los efectos observados sobre la agregación de los péptidos polyQ₇₉-EGFP y mHTT_{Q85}-GFP, resultados desde los que también podríamos inferir que el tratamiento con estos extractos también presentaría efectos sobre la agregación de diferentes proteínas relacionadas al desarrollo de enfermedades neurodegenerativas. Más específicamente, las diferencias cuantitativas en el perfil químico entre los EACs y EEAs dan cuenta de las diferencias en los efectos que estos presentan sobre la agregación de proteínas relacionadas al desarrollo de la enfermedad de Huntington.

Además, debido a que los frutos de murtila estudiados fueron cultivados bajo las mismas condiciones edafoclimáticas, las diferencias observadas a nivel de composición química y propiedades farmacológicas de sus extractos, son atribuibles a las diferencias a nivel del genotipo de cada muestra de murtila, demostrando la hipótesis planteada.

Considerando los efectos tanto directos como indirectos de los compuestos polifenólicos sobre la agregación proteica anormal, la evidencia respecto a la biodisponibilidad de estos compuestos, sumados a la baja toxicidad celular y a los significativos efectos sobre la agregación anormal de proteínas, el EET 19-1 se posiciona como un candidato prometedor para llevar a cabo estudios en modelos *in vivo* de neurodegeneración. Por lo tanto, si dichos estudios preclínicos confirmaran sus propiedades neuroprotectoras, el EET 19-1 podría ser utilizado para el desarrollo de un producto nutracéutico para la prevención de enfermedades neurodegenerativas.

VIII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Adegbuyiro, A., Sedighi, F., Pilkington, A. W. t., Groover, S., & Legleiter, J. (2017). Proteins Containing Expanded Polyglutamine Tracts and Neurodegenerative Disease. *Biochemistry*, *56*(9), 1199-1217.
- Agati, G., Azzarello, E., Pollastri, S., & Tattini, M. (2012). Flavonoids as antioxidants in plants: location and functional significance. *Plant Sci*, *196*, 67-76.
- Agati, G., Brunetti, C., Di Ferdinando, M., Ferrini, F., Pollastri, S., & Tattini, M. (2013). Functional roles of flavonoids in photoprotection: new evidence, lessons from the past. *Plant Physiol Biochem*, *72*, 35-45.
- Aguirre, M. C., Delporte, C., Backhouse, N., Erazo, S., Letelier, M. E., Cassels, B. K., . . . Negrete, R. (2006). Topical anti-inflammatory activity of 2alpha-hydroxy pentacyclic triterpene acids from the leaves of *Ugni molinae*. *Bioorg Med Chem*, *14*(16), 5673-5677.
- 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*(1), 67-78.
- Andarzi Gargari, S., Barzegar, A., & Tarinejad, A. (2018). The role of phenolic OH groups of flavonoid compounds with H-bond formation ability to suppress amyloid mature fibrils by destabilizing beta-sheet conformation of monomeric Aβ₁₇₋₄₂. *PLoS One*, *13*(6).
- Apostol, B. L., Kazantsev, A., Raffioni, S., Illes, K., Pallos, J., Bodai, L., . . . Thompson, L. M. (2002). A cell-based assay for aggregation inhibitors as therapeutics of polyglutamine-repeat disease and validation in *Drosophila*. *PNAS*, *100*(10), 5950–5955.
- Arancibia-Radich, J., Gonzalez-Blazquez, R., Alcalá, M., Martín-Ramos, M., Viana, M., Arribas, S., . . . Gil-Ortega, M. (2019). Beneficial effects of murtilla extract and madecassic acid on insulin sensitivity and endothelial function in a model of diet-induced obesity. *Sci Rep*, *9*(1), 599.
- Arancibia-Radich, J., Peña-Cerda, M., Jara, D., Valenzuela-Bustamante, P., Goity, L., Valenzuela-Barra, G., . . . Seguel, I. (2016). Comparative study of anti-inflammatory activity and qualitative-quantitative composition of triterpenoids from

- ten genotypes of *Ugni molinae*. *Boletín Latinoamericano y del Caribe de Plantas Medicinales y Aromáticas*, 15(5), 274-287.
- Arrasate, M., Mitra, S., Schweitzer, E. S., Segal, M. R., & Finkbeiner, S. (2004). Inclusion body formation reduces levels of mutant huntingtin and the risk of neuronal death. *Nature*, 431, 805-810.
- 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 murtila (*Ugni molinae* Turcz.). *Food Science and Technology (Campinas)*, 34(4), 667-679.
- Bailus, B. J., & Ellerby, L. M. (2016). Diseases of Protein Folding: Huntington's Disease and Amyotrophic Lateral Sclerosis. In *Encyclopedia of Cell Biology* (Vol. 1, pp. 115-121): Elsevier.
- Balch, W. E., Morimoto, R. I., Dillin, A., & Kelly, J. W. (2008). Adapting proteostasis for disease intervention. *Science*, 319(5865), 916-919.
- Barnes, J. S., Nguyen, H. P., Shen, S., & Schug, K. A. (2009). General method for extraction of blueberry anthocyanins and identification using high performance liquid chromatography-electrospray ionization-ion trap-time of flight-mass spectrometry. *J Chromatogr A*, 1216(23), 4728-4735.
- Bourdenx, M., Koulakiotis, N. S., Sanoudou, D., Bezard, E., Dehay, B., & Tsarbopoulos, A. (2017). Protein aggregation and neurodegeneration in prototypical neurodegenerative diseases: Examples of amyloidopathies, tauopathies and synucleinopathies. *Prog Neurobiol*, 155, 171-193.
- Brito, A., Areche, C., Sepulveda, B., Kennelly, E. J., & Simirgiotis, M. J. (2014). Anthocyanin characterization, total phenolic quantification and antioxidant features of some Chilean edible berry extracts. *Molecules*, 19(8), 10936-10955.
- Brouillet, E. (2014). The 3-NP Model of Striatal Neurodegeneration. *Curr Protoc Neurosci*, 67, 9 48 41-14.
- Bugueño, Í. (2015). *Evaluación de las propiedades inhibitorias sobre enzimas que regulan la glicemia de extractos de hojas de diferentes genotipos de Ugni molinae*. (Químico Farmacéutico Tesis de Pregrado). Universidad de Chile, Chile. Retrieved from <http://repositorio.uchile.cl/handle/2250/137517>

- Camilleri, A., Zarb, C., Caruana, M., Ostermeier, U., Ghio, S., Hogen, T., . . . Vassallo, N. (2013). Mitochondrial membrane permeabilisation by amyloid aggregates and protection by polyphenols. *Biochim Biophys Acta*, *1828*(11), 2532-2543.
- Carija, A., Navarro, S., de Groot, N. S., & Ventura, S. (2017). Protein aggregation into insoluble deposits protects from oxidative stress. *Redox Biol*, *12*, 699-711.
- Castañeda-Ovando, A., Pacheco-Hernández, M. d. L., Páez-Hernández, M. E., Rodríguez, J. A., & Galán-Vidal, C. A. (2009). Chemical studies of anthocyanins: A review. *Food Chemistry*, *113*(4), 859-871.
- Chakraborty, J., Singh, R., Dutta, D., Naskar, A., Rajamma, U., & Mohanakumar, K. P. (2014). Quercetin improves behavioral deficiencies, restores astrocytes and microglia, and reduces serotonin metabolism in 3-nitropropionic acid-induced rat model of Huntington's Disease. *CNS Neurosci Ther*, *20*(1), 10-19.
- Chiti, F., & Dobson, C. M. (2017). Protein Misfolding, Amyloid Formation, and Human Disease: A Summary of Progress Over the Last Decade. *Annu Rev Biochem*, *86*, 27-68.
- Chudzik, M., Korzonek-Szlacheta, I., & Krol, W. (2015). Triterpenes as potentially cytotoxic compounds. *Molecules*, *20*(1), 1610-1625.
- 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.
- Ciechanover, A., & Kwon, Y. T. (2015). Degradation of misfolded proteins in neurodegenerative diseases: therapeutic targets and strategies. *Exp Mol Med*, *47*, e147.
- Cujic, N., Savikin, K., Jankovic, T., Pljevljakusic, D., Zdunic, G., & Ibric, S. (2016). Optimization of polyphenols extraction from dried chokeberry using maceration as traditional technique. *Food Chem*, *194*, 135-142.
- D'Angelo, S., Martino, E., Ilisso, C. P., Bagarolo, M. L., Porcelli, M., & Cacciapuoti, G. (2017). Pro-oxidant and pro-apoptotic activity of polyphenol extract from Annurca apple and its underlying mechanisms in human breast cancer cells. *Int J Oncol*, *51*(3), 939-948.
- D'Archivio, M., Filesi, C., Vari, R., Scazzocchio, B., & Masella, R. (2010). Bioavailability of the polyphenols: status and controversies. *Int J Mol Sci*, *11*(4), 1321-1342.

- Dai, J., & Mumper, R. J. (2010). Plant phenolics: extraction, analysis and their antioxidant and anticancer properties. *Molecules*, *15*(10), 7313-7352.
- Das, S., Stark, L., Musgrave, I. F., Pukala, T., & Smid, S. D. (2016). Bioactive polyphenol interactions with beta amyloid: a comparison of binding modelling, effects on fibril and aggregate formation and neuroprotective capacity. *Food Funct*, *7*(2), 1138-1146.
- Durst, R. W., & Wrolstad, R. E. (2001). Separation and Characterization of Anthocyanins by HPLC. *Current Protocols in Food Analytical Chemistry*.
- Eghbaliferiz, S., & Iranshahi, M. (2016). Prooxidant Activity of Polyphenols, Flavonoids, Anthocyanins and Carotenoids: Updated Review of Mechanisms and Catalyzing Metals. *Phytother Res*, *30*(9), 1379-1391.
- Fabre, N., Rustan, I., de Hoffmann, E., & Quetin-Leclercq, J. (2001). Determination of Flavone, Flavonol, and Flavanone Aglycones by Negative Ion Liquid Chromatography Electrospray Ion Trap Mass Spectrometry. *American Society for Mass Spectrometry*, *12*, 707-715.
- Falcone Ferreyra, M. L., Rius, S. P., & Casati, P. (2012). Flavonoids: biosynthesis, biological functions, and biotechnological applications. *Front Plant Sci*, *3*, 222.
- Feliciano, R. P., Istas, G., Heiss, C., & Rodriguez-Mateos, A. (2016). Plasma and Urinary Phenolic Profiles after Acute and Repetitive Intake of Wild Blueberry. *Molecules*, *21*(9).
- Fichou, D., Ristivojevic, P., & Morlock, G. E. (2016). Proof-of-Principle of rTLC, an Open-Source Software Developed for Image Evaluation and Multivariate Analysis of Planar Chromatograms. *Anal Chem*, *88*(24), 12494-12501.
- Figueira, I., Garcia, G., Pimpao, R. C., Terrasso, A. P., Costa, I., Almeida, A. F., . . . Santos, C. N. (2017). Polyphenols journey through blood-brain barrier towards neuronal protection. *Sci Rep*, *7*(1), 11456.
- Figuroa, D. (2015). *Estudio de propiedades anti-inflamatorias de extractos foliares de dos genotipos de murtila (Ugni molinae Turcz.)*. (Química Farmacéutica Tesis de Pregrado). Universidad de Chile, Chile. Retrieved from <http://repositorio.uchile.cl/handle/2250/137531>
- Filomeni, G., Graziani, I., De Zio, D., Dini, L., Centonze, D., Rotilio, G., & Ciriolo, M. R. (2012). Neuroprotection of kaempferol by autophagy in models of rotenone-

- mediated acute toxicity: possible implications for Parkinson's disease. *Neurobiol Aging*, 33(4), 767-785.
- Fuentes, L., Figueroa, C. R., Valdenegro, M., & Vinet, R. (2019). Patagonian Berries: Healthy Potential and the Path to Becoming Functional Foods. *Foods*, 8(8).
- Galanakis, C. M., Goulas, V., Tsakona, S., Manganaris, G. A., & Gekas, V. (2013). A Knowledge Base for The Recovery of Natural Phenols with Different Solvents. *International Journal of Food Properties*, 16(2), 382-396.
- Goity, L. (2013). *Caracterización de los compuestos activos de ugni molinae (murtilla) y sus potenciales efectos hipoglicemiantes, anti-inflamatorios y antioxidantes*. (PhD Tesis de Posgrado). Universidad de Chile, Chile. Retrieved from <http://repositorio.uchile.cl/handle/2250/114869>
- Goity, L., Queupil, M. J., Jara-Moreno, D., Alegría, S., Peña-Cerda, M., Barriga, A., . . . 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.
- Grabska-Kobylecka, I., Kaczmarek-Bak, J., Figlus, M., Prymont-Przyminska, A., Zwolinska, A., Sarniak, A., . . . Nowak, D. (2020). The Presence of Caffeic Acid in Cerebrospinal Fluid: Evidence That Dietary Polyphenols Can Cross the Blood-Brain Barrier in Humans. *Nutrients*, 12(5).
- Granato, D., Santos, J. S., Maciel, L. G., & Nunes, D. S. (2016). Chemical perspective and criticism on selected analytical methods used to estimate the total content of phenolic compounds in food matrices. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 80, 266-279.
- Hanaki, M., Murakami, K., Akagi, K., & Irie, K. (2016). Structural insights into mechanisms for inhibiting amyloid beta42 aggregation by non-catechol-type flavonoids. *Bioorg Med Chem*, 24(2), 304-313.
- Harrington, C. R., Storey, J. M., Clunas, S., Harrington, K. A., Horsley, D., Ishaq, A., . . . Wischik, C. M. (2015). Cellular Models of Aggregation-dependent Template-directed Proteolysis to Characterize Tau Aggregation Inhibitors for Treatment of Alzheimer Disease. *J Biol Chem*, 290(17), 10862-10875.

- Harvey, A. L., Edrada-Ebel, R., & Quinn, R. J. (2015). The re-emergence of natural products for drug discovery in the genomics era. *Nat Rev Drug Discov*, *14*(2), 111-129.
- Heim, K. E., Tagliaferro, A. R., & Bobilya, D. J. (2002). Flavonoid antioxidants: chemistry, metabolism and structure-activity relationships. *Journal of Nutritional Biochemistry*, *13*, 572-584.
- Hipp, M. S., Park, S. H., & Hartl, F. U. (2014). Proteostasis impairment in protein-misfolding and -aggregation diseases. *Trends Cell Biol*, *24*(9), 506-514.
- Iannetti, E. F., Prigione, A., Smeitink, J. A. M., Koopman, W. J. H., Beyrath, J., & Renkema, H. (2019). Live-Imaging Readouts and Cell Models for Phenotypic Profiling of Mitochondrial Function. *Front Genet*, *10*, 131.
- Invernizzi, G., Papaleo, E., Sabate, R., & Ventura, S. (2012). Protein aggregation: mechanisms and functional consequences. *Int J Biochem Cell Biol*, *44*(9), 1541-1554.
- Ittner, L. M., & Gotz, J. (2011). Amyloid-beta and tau--a toxic pas de deux in Alzheimer's disease. *Nat Rev Neurosci*, *12*(2), 65-72.
- Jara-Moreno, D., Castro-Torres, R. D., Ettcheto, M., Auladell, C., Kogan, M. J., Folch, J., . . . Camins, A. (2018). The Ethyl Acetate Extract of Leaves of *Ugni molinae* Turcz. Improves Neuropathological Hallmarks of Alzheimer's Disease in Female APP^{swe}/PS1^{dE9} Mice Fed with a High Fat Diet. *J Alzheimers Dis*, *66*(3), 1175-1191.
- Jara-Moreno, D., Riveros, A. L., Barriga, A., Kogan, M. J., & Delporte, C. (2020). Inhibition of beta-amyloid Aggregation of *Ugni molinae* Extracts. *Curr Pharm Des*, *26*(12), 1365-1376.
- Joshi, D. D. (2012). *Herbal drugs and Fingerprints: Evidence Based Herbal Drugs*: Springer.
- Joshi, V., Mishra, R., Upadhyay, A., Amanullah, A., Poluri, K. M., Singh, S., . . . Mishra, A. (2019). Polyphenolic flavonoid (Myricetin) upregulated proteasomal degradation mechanisms: Eliminates neurodegenerative proteins aggregation. *J Cell Physiol*, *234*(11), 20900-20914.
- Junqueira-Goncalves, M. P., Yanez, L., Morales, C., Navarro, M., R, A. C., & Zuniga, G. E. (2015). Isolation and characterization of phenolic compounds and

- anthocyanins from Murta (*Ugni molinae* Turcz.) fruits. Assessment of antioxidant and antibacterial activity. *Molecules*, *20*(4), 5698-5713.
- Kawabata, K., Yoshioka, Y., & Terao, J. (2019). Role of Intestinal Microbiota in the Bioavailability and Physiological Functions of Dietary Polyphenols. *Molecules*, *24*(2).
- Khan, E., Biswas, S., Mishra, S. K., Mishra, R., Samanta, S., Mishra, A., . . . Kumar, A. (2019). Rationally designed small molecules targeting toxic CAG repeat RNA that causes Huntington's disease (HD) and spinocerebellar ataxia (SCAs). *Biochimie*, *163*, 21-32.
- Khan, E., Tawani, A., Mishra, S. K., Verma, A. K., Upadhyay, A., Kumar, M., . . . Kumar, A. (2018). Myricetin Reduces Toxic Level of CAG Repeats RNA in Huntington's Disease (HD) and Spino Cerebellar Ataxia (SCAs). *ACS Chem Biol*, *13*(1), 180-188.
- Kim, H. K., Choi, Y. H., & Verpoorte, R. (2010). NMR-based metabolomic analysis of plants. *Nat Protoc*, *5*(3), 536-549.
- Koehn, F. E., & Carter, G. T. (2005). The evolving role of natural products in drug discovery. *Nat Rev Drug Discov*, *4*(3), 206-220.
- Koli, R., Erlund, I., Jula, A., Marniemi, J., Mattila, P., & Alfthan, G. (2010). Bioavailability of various polyphenols from a diet containing moderate amounts of berries. *J Agric Food Chem*, *58*(7), 3927-3932.
- Krikorian, R., Shidler, M. D., Nash, T. A., Kalt, W., Vinqvist-Tymchuk, M. R., Shukitt-Hale, B., & Joseph, J. A. (2010). Blueberry supplementation improves memory in older adults. *J Agric Food Chem*, *58*(7), 3996-4000.
- Lecaros, I., Lecaros, M. A., Gloger, R., Scheuermann, E., & Samarotto, M. (2014). *Chile Saludable: Oportunidades y Desafíos de Innovación*. Retrieved from Chile:
- Leon-Gonzalez, A. J., Auger, C., & Schini-Kerth, V. B. (2015). Pro-oxidant activity of polyphenols and its implication on cancer chemoprevention and chemotherapy. *Biochem Pharmacol*, *98*(3), 371-380.
- Levine, B., & Kroemer, G. (2008). Autophagy in the pathogenesis of disease. *Cell*, *132*(1), 27-42.
- Lewandowska, U., Szewczyk, K., Hrabec, E., Janecka, A., & Gorlach, S. (2013). Overview of metabolism and bioavailability enhancement of polyphenols. *J Agric Food Chem*, *61*(50), 12183-12199.

- Li, D., Meng, X., & Li, B. (2016). Profiling of anthocyanins from blueberries produced in China using HPLC-DAD-MS and exploratory analysis by principal component analysis. *Journal of Food Composition and Analysis*, *47*, 1-7.
- Liu, R., Meng, F., Zhang, L., Liu, A., Qin, H., Lan, X., . . . Du, G. (2011). Luteolin isolated from the medicinal plant *Elsholtzia rugulosa* (Labiatae) prevents copper-mediated toxicity in beta-amyloid precursor protein Swedish mutation overexpressing SH-SY5Y cells. *Molecules*, *16*(3), 2084-2096.
- Lopez de Dicastillo, C., Bustos, F., Valenzuela, X., Lopez-Carballo, G., Vilarino, J. M., & Galotto, M. J. (2017). Chilean berry *Ugni molinae* Turcz. fruit and leaves extracts with interesting antioxidant, antimicrobial and tyrosinase inhibitory properties. *Food Res Int*, *102*, 119-128.
- López, J., Vega-Gálvez, A., Rodríguez, A., Uribe, E., & Bilbao-Sainz, C. (2018). MURTA (*Ugni molinae* Turcz.): UNA REVISIÓN SOBRE COMPOSICIÓN QUÍMICA, COMPONENTES FUNCIONALES Y ACTIVIDADES BIOLÓGICAS DE LAS HOJAS Y FRUTO. *Chilean J. Agric. Anim. Sci., ex Agro-Ciencia*, *34*(1), 1-14.
- Macready, A. L., Kennedy, O. B., Ellis, J. A., Williams, C. M., Spencer, J. P., & Butler, L. T. (2009). Flavonoids and cognitive function: a review of human randomized controlled trial studies and recommendations for future studies. *Genes Nutr*, *4*(4), 227-242.
- Manach, C., Scalbert, A., Morand, C., Remesy, C., & Jimenez, L. (2004). Polyphenols: food sources and bioavailability. *Am J Clin Nutr*, *79*(5), 727-747.
- Mardones, P., Martinez, G., & Hetz, C. (2015). Control of systemic proteostasis by the nervous system. *Trends Cell Biol*, *25*(1), 1-10.
- Margraf, T., Karnopp, A. R., Rosso, N. D., & Granato, D. (2015). Comparison between Folin-Ciocalteu and Prussian Blue Assays to Estimate The Total Phenolic Content of Juices and Teas Using 96-Well Microplates. *J Food Sci*, *80*(11), C2397-2403.
- Marsh, D. T., Das, S., Ridell, J., & Smid, S. D. (2017). Structure-activity relationships for flavone interactions with amyloid beta reveal a novel anti-aggregatory and neuroprotective effect of 2',3',4'-trihydroxyflavone (2-D08). *Bioorg Med Chem*, *25*(14), 3827-3834.
- Martinez-Vicente, M., Talloczy, Z., Wong, E., Tang, G., Koga, H., Kaushik, S., . . . Cuervo, A. M. (2010). Cargo recognition failure is responsible for inefficient autophagy in Huntington's disease. *Nat Neurosci*, *13*(5), 567-576.

- Mathesius, U. (2018). Flavonoid Functions in Plants and Their Interactions with Other Organisms. *Plants (Basel)*, 7(2).
- Menzies, F. M., Fleming, A., Caricasole, A., Bento, C. F., Andrews, S. P., Ashkenazi, A., . . . Rubinsztein, D. C. (2017). Autophagy and Neurodegeneration: Pathogenic Mechanisms and Therapeutic Opportunities. *Neuron*, 93(5), 1015-1034.
- Miljkovic Opsenica, D., Ristivojevic, P., Trifkovic, J., Vovk, I., Lusic, D., & Tesic, Z. (2016). TLC Fingerprinting and Pattern Recognition Methods in the Assessment of Authenticity of Poplar-Type Propolis. *J Chromatogr Sci*, 54(7), 1077-1083.
- Montaz, S., Memariani, Z., El-Senduny, F. F., Sanadgol, N., Golab, F., Katebi, M., . . . Abdollahi, M. (2020). Targeting Ubiquitin-Proteasome Pathway by Natural Products: Novel Therapeutic Strategy for Treatment of Neurodegenerative Diseases. *Front Physiol*, 11, 361.
- Nabavi, S. F., Sureda, A., Dehpour, A. R., Shirooie, S., Silva, A. S., Devi, K. P., . . . Nabavi, S. M. (2018). Regulation of autophagy by polyphenols: Paving the road for treatment of neurodegeneration. *Biotechnol Adv*, 36(6), 1768-1778.
- Ono, K., Li, L., Takamura, Y., Yoshiike, Y., Zhu, L., Han, F., . . . Yamada, M. (2012). Phenolic compounds prevent amyloid beta-protein oligomerization and synaptic dysfunction by site-specific binding. *J Biol Chem*, 287(18), 14631-14643.
- Ono, K., & Yamada, M. (2006). Antioxidant compounds have potent anti-fibrillogenic and fibril-destabilizing effects for alpha-synuclein fibrils in vitro. *J Neurochem*, 97(1), 105-115.
- Ono, K., Yoshiike, Y., Takashima, A., Hasegawa, K., Naiki, H., & Yamada, M. (2003). Potent anti-amyloidogenic and fibril-destabilizing effects of polyphenols in vitro: implications for the prevention and therapeutics of Alzheimer's disease. *J Neurochem*, 87(1), 172-181.
- Pasinelli, P., & Brown, R. H. (2006). Molecular biology of amyotrophic lateral sclerosis: insights from genetics. *Nat Rev Neurosci*, 7(9), 710-723.
- 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 Chem*, 191, 12-20.
- Peña-Cerda, M. (2011). *Determinación de la saponina mayoritaria obtenida de las saponinas de hojas de Ugni molinae, Turcz. (Murtilla) y evaluación de la actividad inhibitoria sobre glicógeno fosforilasa A.* (Químico Farmacéutico Tesis de

- Pregrado). Universidad de Chile, Chile. Retrieved from http://repositorio.uchile.cl/tesis/uchile/2011/qf-pena_me/html/index-frames.html
- 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 Chem*, *215*, 219-227.
- Pérez-Arancibia, R. (2015). *Cuantificación de flavonoides y ácido gálico en hojas de distintos genotipos de ugni molinae turcz. y evaluación de su actividad antioxidante*. (Químico Farmacéutico). Universidad de Chile, Chile.
- Pompeu, D. R., Silva, E. M., & Rogez, H. (2009). Optimisation of the solvent extraction of phenolic antioxidants from fruits of *Euterpe oleracea* using Response Surface Methodology. *Bioresour Technol*, *100*(23), 6076-6082.
- Porzoor, A., Alford, B., Hugel, H. M., Grando, D., Caine, J., & Macreadie, I. (2015). Anti-amyloidogenic properties of some phenolic compounds. *Biomolecules*, *5*(2), 505-527.
- Querfurth, H. W., & LaFerla, F. M. (2010). Alzheimer's Disease. *The new england journal of medicine*, *362*(4), 329 - 344.
- Queupil Carrasco, M. J. (2011). *Actividad inhibitoria de glicógeno fosforilasa a de los extractos obtenidos desde las hojas de ugni molinae turcz. (murtilla) myrtaceae. Identificación de los principios activos*. (Químico Farmacéutico). Universidad de Chile, Chile.
- Ramirez, J. E., Zambrano, R., Sepulveda, B., Kennelly, E. J., & Simirgiotis, M. J. (2015). Anthocyanins and antioxidant capacities of six Chilean berries by HPLC-HR-ESI-ToF-MS. *Food Chem*, *176*, 106-114.
- Regitz, C., Dussling, L. M., & Wenzel, U. (2014). Amyloid-beta (Aβ₁₋₄₂)-induced paralysis in *Caenorhabditis elegans* is inhibited by the polyphenol quercetin through activation of protein degradation pathways. *Mol Nutr Food Res*, *58*(10), 1931-1940.
- Rendeiro, C., Rhodes, J. S., & Spencer, J. P. (2015). The mechanisms of action of flavonoids in the brain: Direct versus indirect effects. *Neurochem Int*, *89*, 126-139.
- Rodrigo, R., & Gil-Becerra, D. (2014). Implications of Polyphenols on Endogenous Antioxidant Defense Systems in Human Diseases. In *Polyphenols in Human Health and Disease* (pp. 201-217).

- Rodríguez, K., Ah-Hen, K. S., Vega-Gálvez, A., Vásquez, V., Quispe-Fuentes, I., Rojas, P., & Lemus-Mondaca, R. (2016). Changes in bioactive components and antioxidant capacity of maqui, *Aristotelia chilensis* [Mol] Stuntz, berries during drying. *LWT - Food Science and Technology*, *65*, 537-542.
- Ross, C. A., & Poirier, M. A. (2005). What is the role of protein aggregation in neurodegeneration? *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, *6*, 891–898.
- Ross, C. A., & Tabrizi, S. J. (2011). Huntington's disease: from molecular pathogenesis to clinical treatment. *The Lancet Neurology*, *10*(1), 83-98.
- 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. *J Agric Food Chem*, *59*(5), 1630-1637.
- Rubilar, M., Pinelo, M., Ihl, M., Scheuermann, E., Sineiro, J., & Nuñez, M. J. (2006). Murta leaves (*Ugni molinae* Turcz) as a source of antioxidant polyphenols. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *54*, 59-64.
- Ruiz, A., Hermosin-Gutierrez, 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. *J Agric Food Chem*, *58*(10), 6081-6089.
- Saldanha, L. L., Vilegas, W., & Dokkedal, A. L. (2013). Characterization of flavonoids and phenolic acids in *Myrcia bella* Cambess. using FIA-ESI-IT-MS(n) and HPLC-PAD-ESI-IT-MS combined with NMR. *Molecules*, *18*(7), 8402-8416.
- Santini, A., Cammarata, S. M., Capone, G., Ianaro, A., Tenore, G. C., Pani, L., & Novellino, E. (2018). Nutraceuticals: opening the debate for a regulatory framework. *Br J Clin Pharmacol*, *84*(4), 659-672.
- Seguel, I., Peñaloza, E., Gaete, N., Montenegro, A., & Torres, A. (2000). COLECTA Y CARACTERIZACION MOLECULAR DE GERMOPLASMA DE MURTA (*Ugni molinae* Turcz.) EN CHILE.
- Seguel, I., Torralbo, L., & Shenemann, E. (2017). Murtilla: De berry silvestre a cultivado, y de Chile al mundo. *Otros Berries*. Retrieved from <http://www.redagricola.com/cl/berry-silvestre-cultivado-chile-al-mundo/>

- Shene, C., Reyes, A. K., Villarroel, M., Sineiro, J., Pinelo, M., & Rubilar, M. (2008). Plant location and extraction procedure strongly alter the antimicrobial activity of murta extracts. *European Food Research and Technology*, 228(3), 467-475.
- Soto, C. (2003). Unfolding the role of protein misfolding in neurodegenerative diseases. *Nat Rev Neurosci*, 4(1), 49-60.
- Soto, C. (2012). Transmissible proteins: expanding the prion heresy. *Cell*, 149(5), 968-977.
- Stefani, M., & Rigacci, S. (2013). Protein folding and aggregation into amyloid: the interference by natural phenolic compounds. *Int J Mol Sci*, 14(6), 12411-12457.
- Strathearn, K. E., Yousef, G. G., Grace, M. H., Roy, S. L., Tambe, M. A., Ferruzzi, M. G., . . . Rochet, J. C. (2014). Neuroprotective effects of anthocyanin- and proanthocyanidin-rich extracts in cellular models of Parkinsons disease. *Brain Res*, 1555, 60-77.
- Takahashi, R., Ono, K., Takamura, Y., Mizuguchi, M., Ikeda, T., Nishijo, H., & Yamada, M. (2015). Phenolic compounds prevent the oligomerization of alpha-synuclein and reduce synaptic toxicity. *J Neurochem*, 134(5), 943-955.
- Taylor, D. L. (2007). Past present and future of high content screening and the field of cellomics In D. L. Taylor, J. R. Haskins, & K. A. Giuliano (Eds.), *High Content Screening: A Powerful Approach to Systems Cell Biology and Drug Discovery* (Vol. 356): Humana Press.
- Tian, Y., Liimatainen, J., Alanne, A. L., Lindstedt, A., Liu, P., Sinkkonen, J., . . . Yang, B. (2017). Phenolic compounds extracted by acidic aqueous ethanol from berries and leaves of different berry plants. *Food Chem*, 220, 266-281.
- Ueda, T., Inden, M., Shirai, K., Sekine, S. I., Masaki, Y., Kurita, H., . . . Hozumi, I. (2017). The effects of Brazilian green propolis that contains flavonols against mutant copper-zinc superoxide dismutase-mediated toxicity. *Sci Rep*, 7(1), 2882.
- Valenzuela-Bustamante, P. (2015). *Evaluación de la actividad antioxidante y determinación del contenido de fenoles totales y flavonoides de hojas de diferentes genotipos de Ugni molinae Turcz.* (Química Farmacéuticas Tesis de Pregrado). Universidad de Chile, Chile. Retrieved from <http://repositorio.uchile.cl/handle/2250/134044>

- Vauzour, D., Martinsen, A., & Laye, S. (2015). Neuroinflammatory processes in cognitive disorders: Is there a role for flavonoids and n-3 polyunsaturated fatty acids in counteracting their detrimental effects? *Neurochem Int*, *89*, 63-74.
- Veas, R. (2016). *Evaluación de la actividad inhibitoria de [alfa]-glucosidasa de los extractos de hojas de diez genotipos de Ugni molinae Turcz. y determinación del tipo de inhibición*. Universidad de Chile, Chile.
- Veberic, R., Slatnar, A., Bizjak, J., Stampar, F., & Mikulic-Petkovsek, M. (2015). Anthocyanin composition of different wild and cultivated berry species. *LWT - Food Science and Technology*, *60*(1), 509-517.
- Vepsäläinen, S., Koivisto, H., Pekkarinen, E., Mäkinen, P., Dobson, G., McDougall, G. J., . . . Hiltunen, M. (2013). Anthocyanin-enriched bilberry and blackcurrant extracts modulate amyloid precursor protein processing and alleviate behavioral abnormalities in the APP/PS1 mouse model of Alzheimer's disease. *J Nutr Biochem*, *24*(1), 360-370.
- Verri, W. A., Vicentini, F. T. M. C., Baracat, M. M., Georgetti, S. R., Cardoso, R. D. R., Cunha, T. M., . . . Casagrande, R. (2012). Flavonoids as Anti-Inflammatory and Analgesic Drugs: Mechanisms of Action and Perspectives in the Development of Pharmaceutical Forms. In *Bioactive Natural Products* (pp. 297-330).
- Vidal, R. L., Figueroa, A., Court, F. A., Thielen, P., Molina, C., Wirth, C., . . . Hetz, C. (2012). Targeting the UPR transcription factor XBP1 protects against Huntington's disease through the regulation of FoxO1 and autophagy. *Hum Mol Genet*, *21*(10), 2245-2262.
- Wagner, H., & Bladt, S. (1996). *Plant Drug Analysis: A Thin Layer Chromatography Atlas*. (2nd ed.). Berlin: Springer-Verlag.
- Wang, S. W., Wang, Y. J., Su, Y. J., Zhou, W. W., Yang, S. G., Zhang, R., . . . Liu, R. T. (2012). Rutin inhibits beta-amyloid aggregation and cytotoxicity, attenuates oxidative stress, and decreases the production of nitric oxide and proinflammatory cytokines. *Neurotoxicology*, *33*(3), 482-490.
- Williams, C. M., El Mohsen, M. A., Vauzour, D., Rendeiro, C., Butler, L. T., Ellis, J. A., . . . Spencer, J. P. (2008). Blueberry-induced changes in spatial working memory correlate with changes in hippocampal CREB phosphorylation and brain-derived neurotrophic factor (BDNF) levels. *Free Radic Biol Med*, *45*(3), 295-305.

- Williams, R. J., & Spencer, J. P. (2012). Flavonoids, cognition, and dementia: actions, mechanisms, and potential therapeutic utility for Alzheimer disease. *Free Radic Biol Med*, 52(1), 35-45.
- Wyrepkowski, C. C., Costa, D. L., Sinhorin, A. P., Vilegas, W., De Grandis, R. A., Resende, F. A., . . . dos Santos, L. C. (2014). Characterization and quantification of the compounds of the ethanolic extract from *Caesalpinia ferrea* stem bark and evaluation of their mutagenic activity. *Molecules*, 19(10), 16039-16057.
- Zhang, H., & Tsao, R. (2016). Dietary polyphenols, oxidative stress and antioxidant and anti-inflammatory effects. *Current Opinion in Food Science*, 8, 33-42.
- Zhang, J., Chung, T. D., & Oldenburg, K. R. (1999). A Simple Statistical Parameter for Use in Evaluation and Validation of High Throuput Screening Assays. *Journal of Biomolecular Screening*, 4(2), 67-73.
- Zuorro, A., Iannone, A., & Lavecchia, R. (2019). Water–Organic Solvent Extraction of Phenolic Antioxidants from Brewers' Spent Grain. *Processes*, 7(3).
- Zuorro, A., & Lavecchia, R. (2013). Influence of Extraction Conditions on the Recovery of Phenolic Antioxidants from Spent Coffee Grounds. *American Journal of Applied Sciences*, 10(5), 478-486.

Anexo II. Pérdida de agua en el proceso de liofilización

Genotipo	Peso Inicial (g)	Peso Liofilizado (g)	% Pérdida agua
14-4	1000,70	281,30	71,89
19-1	1001,90	256,00	74,45
19-1ha	1004,10	268,30	73,28
19-2	1004,20	222,60	77,83
22-1	1000,90	259,50	74,07
23-2	1004,20	191,00	80,98
27-1	1029,00	217,20	78,89
31-1	1000,50	296,70	70,34

Tabla A1. Pérdida de agua de los frutos de murtila en el proceso de liofilización

Anexo III. Cromatogramas de análisis por CLAE – DAD de los EACs y EEAs de los frutos de distintos genotipos de murtila:

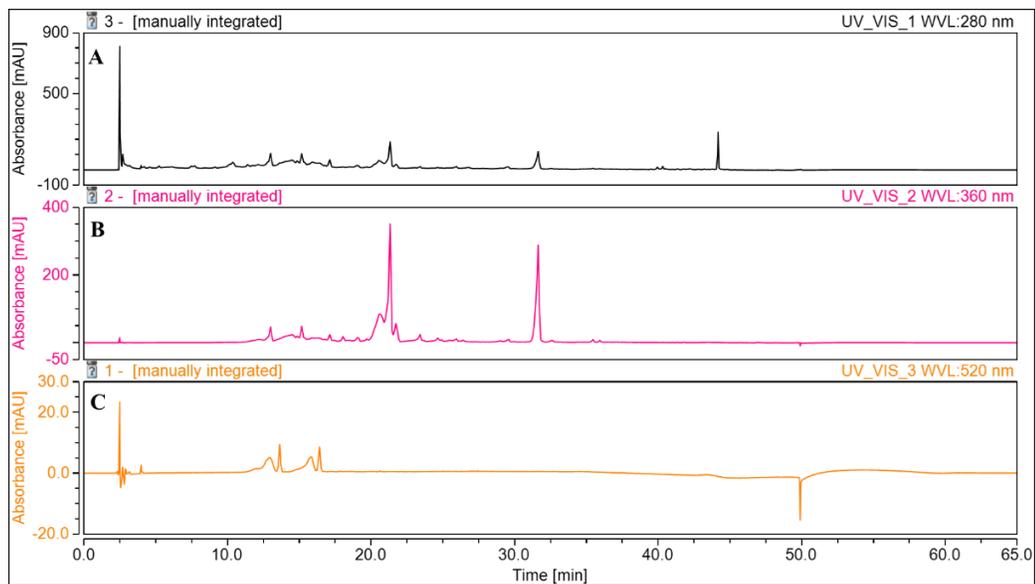


Figura AII.1. Cromatogramas a 280, 360 y 520nm del EAC del genotipo 14-4

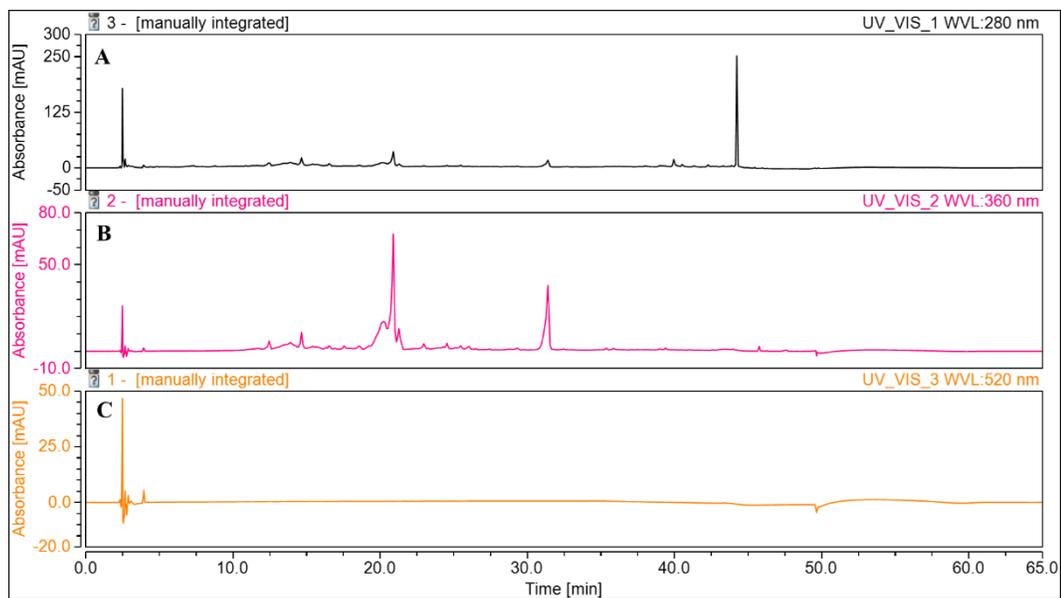


Figura AII.2. Cromatogramas a 280, 360 y 520nm del EEA del G 14-4

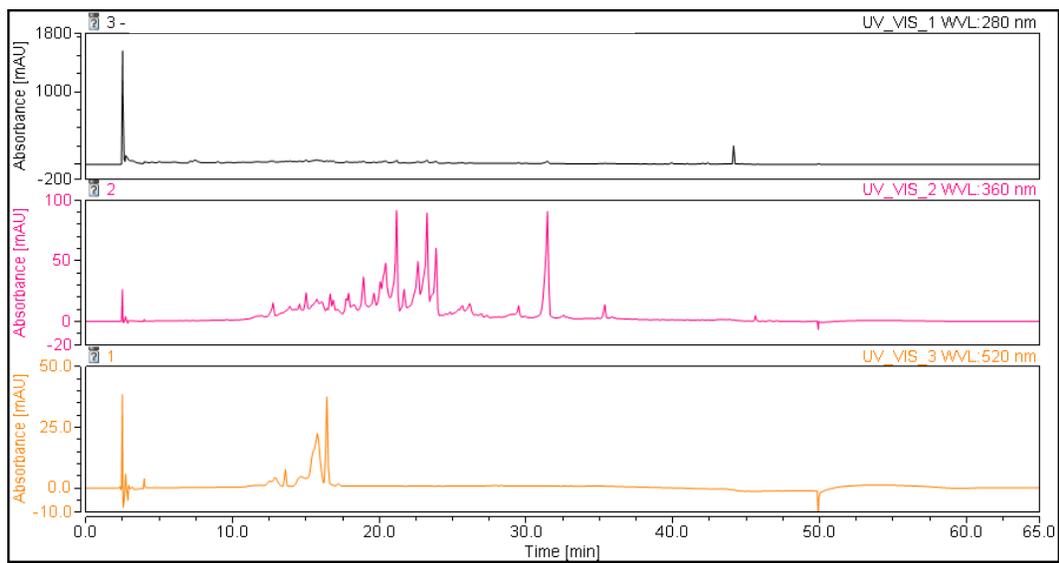


Figura AII.4. Cromatogramas a 280, 360 y 520nm del EAC del G 19-1

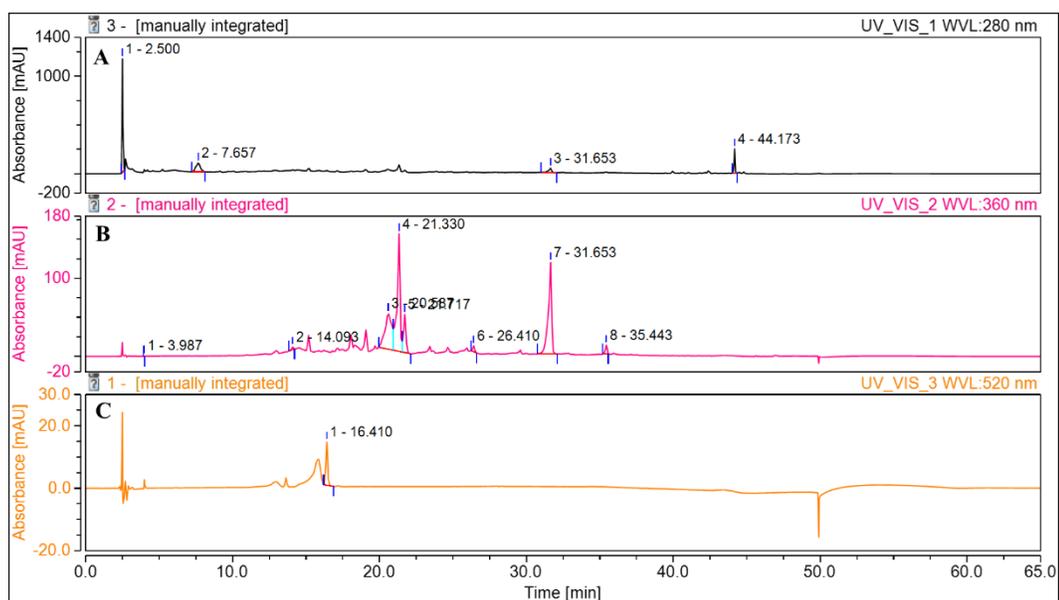


Figura AII.5. Cromatogramas a 280, 360 y 520 nm del EAC del G 19-1 ha

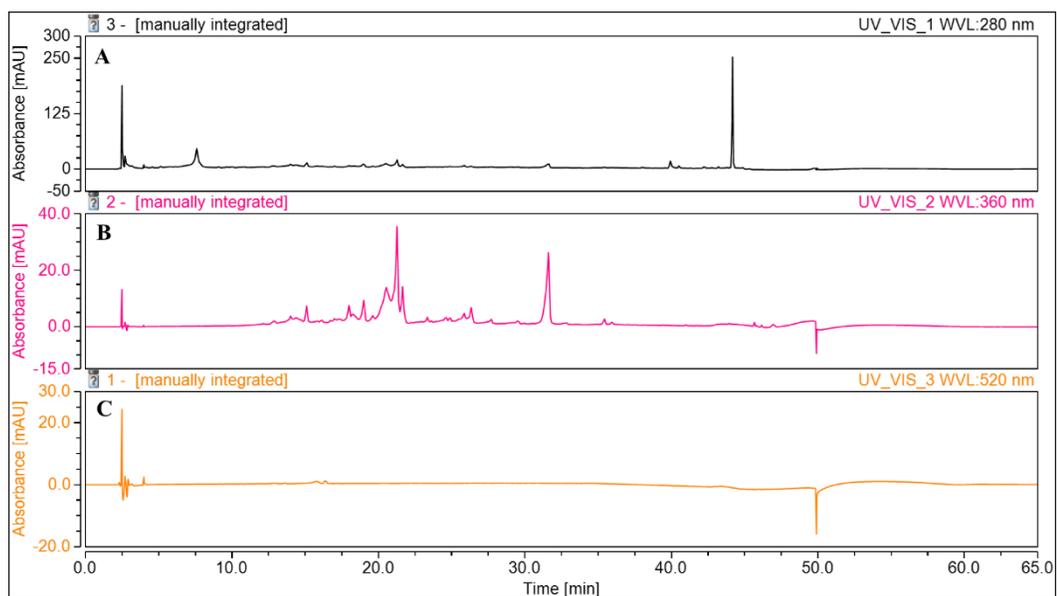


Figura AII.6. Cromatogramas a 280, 360 y 520nm del EEA del G 19-1 ha

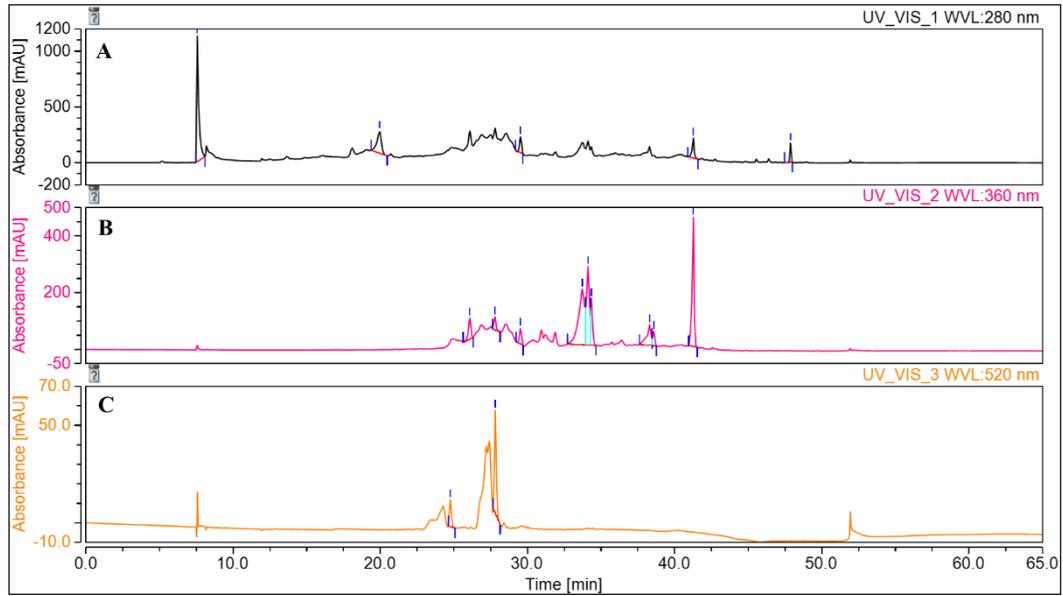


Figura AII.7. Cromatogramas a 280, 360 y 520 nm del EAC del G 19-2.

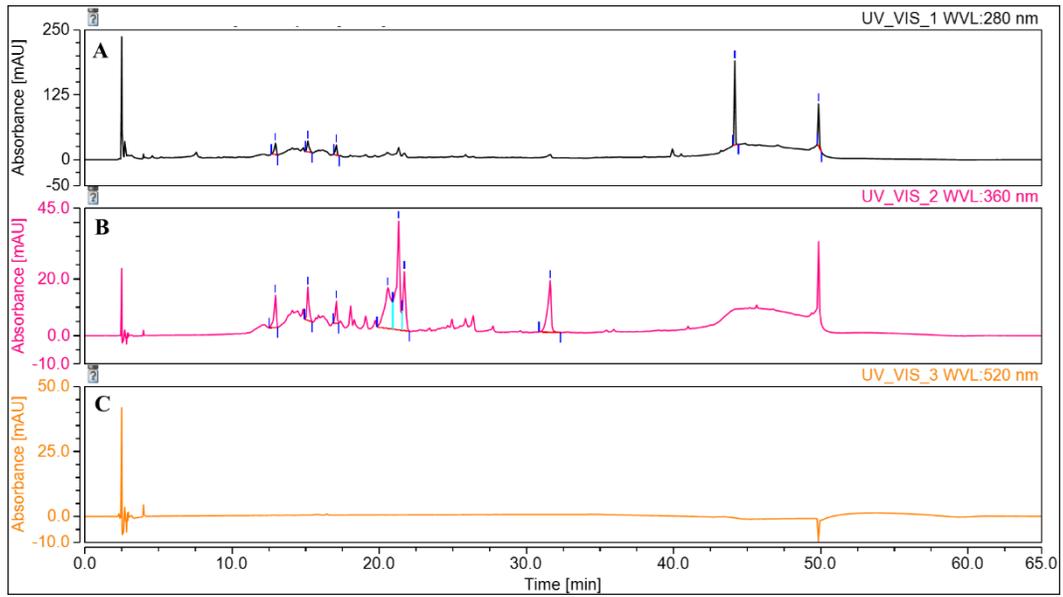


Figura AII.8. Cromatogramas a 280, 360 y 520 nm del EEA del G 19-2.

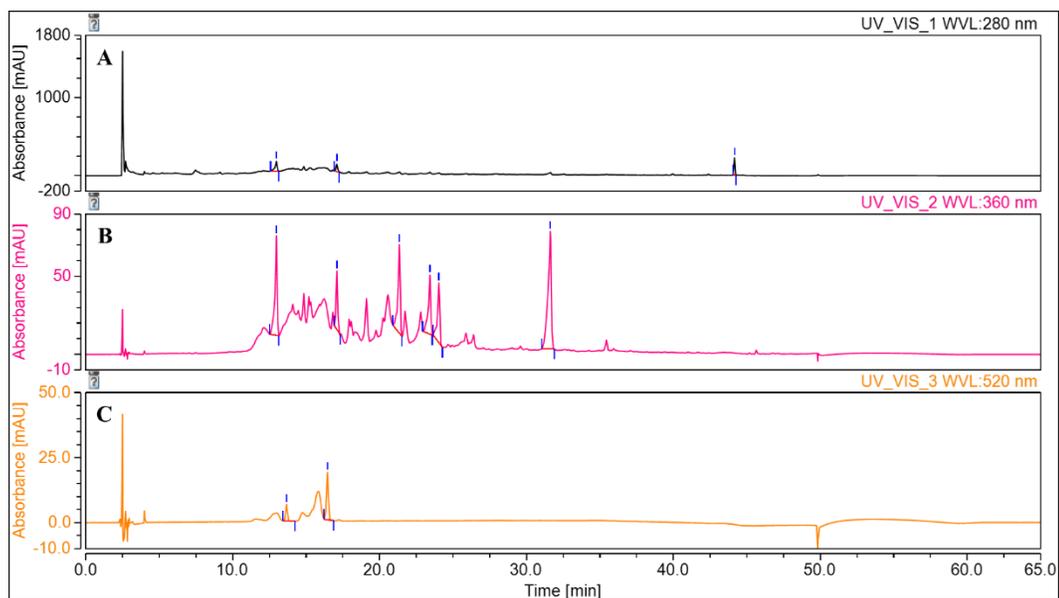


Figura AII.9. Cromatogramas a 280, 360 y 520 nm del EAC del G 22-1.

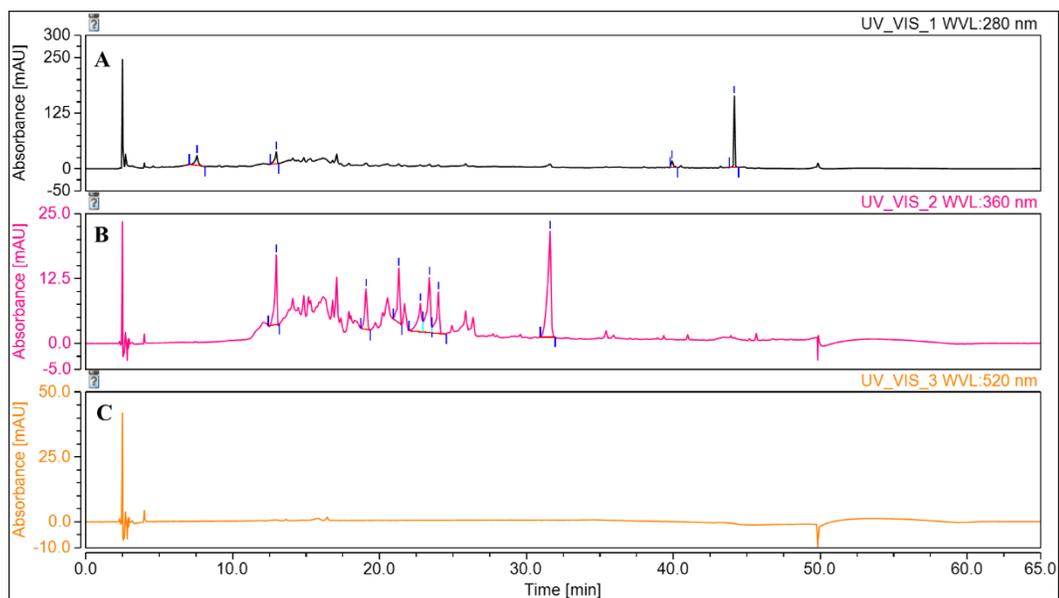


Figura AII.10. Cromatogramas a 280, 360 y 520 nm del EEA del G 22-1.

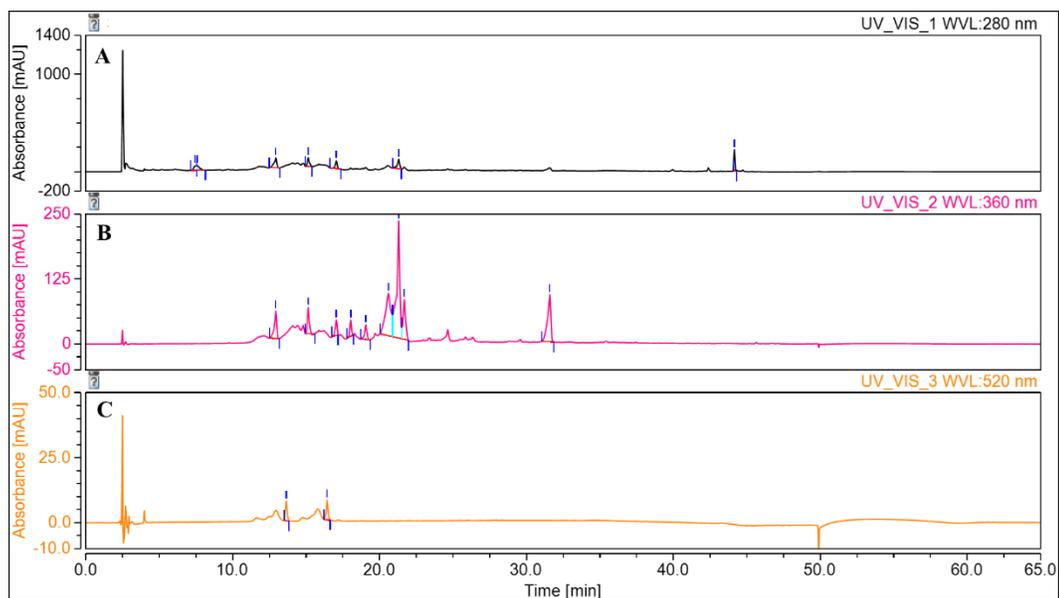


Figura AII.11. Cromatogramas a 280, 360 y 520 nm del EAC del G 23-2.

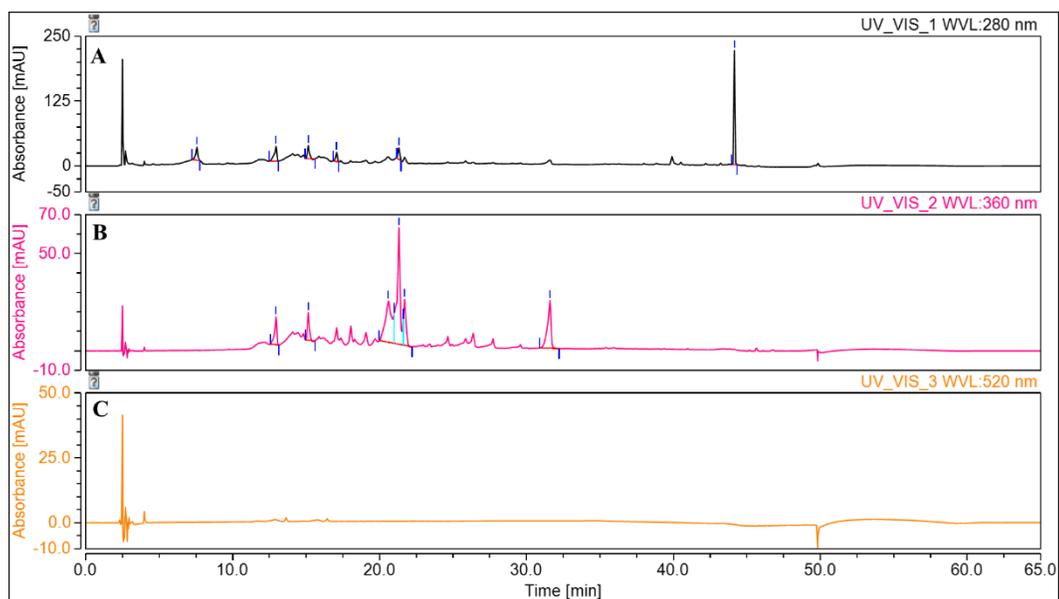


Figura AII.12. Cromatogramas a 280, 360 y 520nm del EEA del G 23-2.

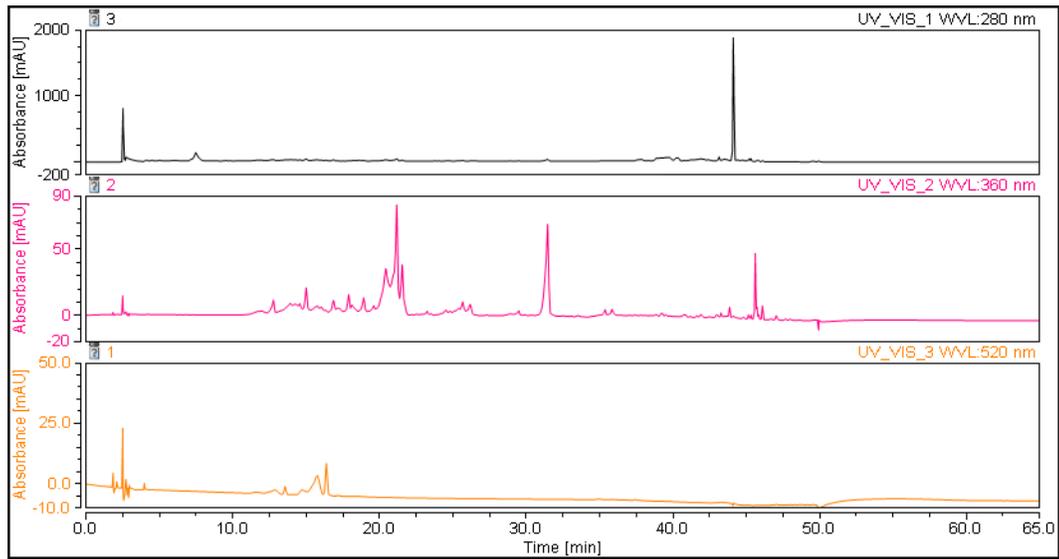


Figura AII.13. Cromatogramas a 280, 360 y 520 nm del EAC del G 27-1.

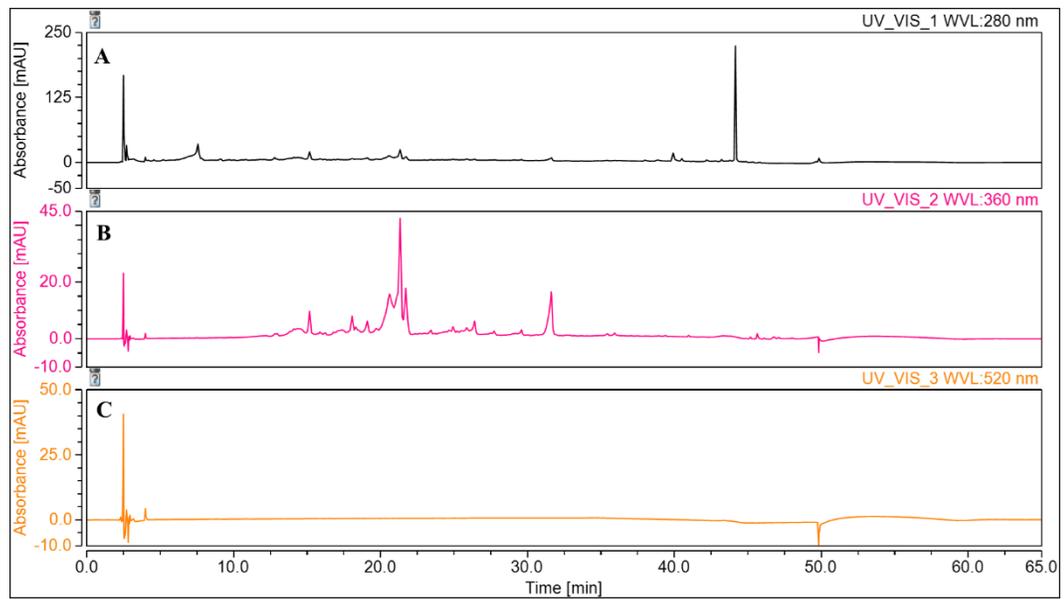


Figura AII.14. Cromatogramas a 280, 360 y 520 nm del EEA del G 27-1.

Anexo IV. Identificación tentativa por CLAE-UV-ESI-EM/EM a 360 nm de compuestos fenólicos en los ESel

Tabla AIII. Resumen de identificación tentativa a 360nm de compuestos fenólicos en los ESel.

#	RT [min]	[M-H] [m/z]	Fragmentos [m/z]		Identificación tentativa	EEA 14-4	EEA 19-1	EEA 19-1ha	EEA 23-2	EEA 27-1
1	3,1	353.1	172.8	111	Ácido cafeoilquinico	*	n.i.	n.i.	*	n.i.
2	3,1	503.1	340.7		Ácido cafeico dihexósido	n.i.	*	n.i.	n.i.	n.i.
3	6,3	483.3	500.2	330.9	169	Digaloil hexosa	n.i.	*	n.i.	n.i.
4	6,3	633.4	420.9	300.9	HHDP-galoil hexosa	n.i.	*	n.i.	n.i.	n.i.
5	7,9	495.2	342.9	168.9	Ácido digaloilquinico	n.i.	*	*	n.i.	*
6	8,3	633.2	420.8	300.8	HHDP-galoil hexosa	n.i.	*	n.i.	*	*
7	8,8	501.1	340.9	178.9	Ácido cafeico dihexósido	n.i.	n.i.	n.i.	n.i.	*
8	10,0	574.8	424.9	331	288.9	Procianidina dimeroo B	n.i.	*	n.i.	n.i.
9	10,1	495.0	342.9	168,8	Ácido digaloilquinico	n.i.	*	*	*	*
10	11,1	483.2	422,9	312,9	270,9	Digaloilhexosa	n.i.	n.i.	*	n.i.
11	11,7	289.1	244.9	161	(Epi)catequina	n.i.	*	n.i.	n.i.	*
12	13,1	453.3	312.9		Digaloilpentosa	n.i.	*	n.i.	n.i.	*
13	13,2	431.6	378.4	278.9	160.8	Apigenina-O-hexósido	n.i.	*	n.i.	n.i.
14	13,9	635.1	464.9		Trigaloil hexosa	n.i.	*	n.i.	n.i.	n.i.
15	14,1	481.3	438.7	330.9		Digaloil hexosa	n.i.	*	n.i.	n.i.
16	14,4	631.4	479	317	Miricetina-O-galoil hexósido	*	*	*	*	*
17	15,0	635.1	469.4		Trigaloil hexosa	*	n.i.	n.i.	n.i.	n.i.
18	15,1	453.6	312.9	168.9		Digaloilpentosa	*	*	n.i.	n.i.
19	15,5	631.3	479	317	Miricetina-O-galoil hexósido	n.i.	*	*	n.i.	n.i.
20	15,5	479.2	316.9		Miricetina-O-hexósido	*	*	*	*	*
21	15,7	401.4	268,9	160,8	bencil alcohol hexosa pentosa	n.i.	n.i.	*	n.i.	n.i.
22	16,0	453.4	312.9	168.8		Digaloilpentosa	*	n.i.	n.i.	n.i.
23	16,3	447.2	448.8	284.9		Canferol-O-hexósido	n.i.	*	*	*
24	16,5	479.1	316,8		Miricetina-O-hexósido	n.i.	*	*	*	*
25	16,7	625.2	463	300,9	Quercetina-O-dihexósido	n.i.	*	*	*	*
26	17,1	631.3	479	316,9	Miricetina-O-galoil hexósido	*	*	*	*	*
27	17,1	577.2	425	286.8	Procianidina dimero B	*	n.i.	n.i.	n.i.	n.i.
28	17,1	615.3	463	301	Quercetina-O-galoil hexósido	n.i.	n.i.	*	n.i.	n.i.
29	17,3	449.3	316,9	168,8	Miricetina-O-pentósido	*	*	*	*	*
30	17,5	463.1	300.8		Quercetina-O-hexósido	*	*	n.i.	*	*
31	18,2	463.1	299.9		Quercetina-O-hexósido	n.i.	*	n.i.	n.i.	n.i.
32	18,6	625.1	462.9	300.9	Quercetina-O-dihexósido	*	n.i.	n.i.	n.i.	n.i.
33	18,9	479.2	316,9		Miricetina-O-hexósido	*	*	*	*	*
34	19,3	463.5	316,9		Miricetina-O-deoxihexósido	n.i.	n.i.	*	n.i.	*
35	19,8	625.5	463	300.9	Quercetina-O-dihexósido	*	n.i.	n.i.	n.i.	n.i.

Continúa en páginas 135 y 136.

#	RT [min]	[M-H] [m/z]	Fragmentos [m/z]			Identificación tentativa	EEA 14-4	EEA 19-1	EEA 19-1ha	EEA 23-2	EEA 27-1
36	19,9	479.2	460.8	315.9	178.8	Miricetina-O-hexósido	*	*	*	*	n.i.
37	20,1	615.3	463,1	301,1		Quercetina-O-galoil hexósido	*	*	*	*	n.i.
38	20,2	615.3	463.1	301.1		Quercetina-O-galoil hexósido	n.i.	n.i.	n.i.	n.i.	*
39	20,8	441.3	288.9	168.8		(Epi)catechin-O-gallato	*	*	n.i.	n.i.	n.i.
40	21,0	449.2	315,9	268,9	150,9	Miricetina-O-pentósido	*	*	*	*	*
41	21,2	625.3	462.9	300.9		Quercetina-O-dihexósido	*	n.i.	n.i.	n.i.	n.i.
42	21,3	449.2	315,9	268,9	150,9	Miricetina-O-pentósido	n.i.	*	*	*	*
43	21,5	615.4	463	301		Quercetina-O-galoil hexósido	n.i.	*	n.i.	n.i.	n.i.
44	21,5	463.1	315.9			Miricetina-O-deoxihexósido	n.i.	*	*	*	n.i.
45	21,6	463.2	301			Quercetina-O-hexósido	n.i.	n.i.	n.i.	n.i.	*
46	21,8	433.6	300.2			Quercetina-O-pentósido	*	*	n.i.	*	n.i.
47	21,9	449.2	316.8	179		Miricetina-O-pentósido	n.i.	*	n.i.	n.i.	n.i.
48	22,2	477.0	300.9			Quercetina-O-glucurónido	*	n.i.	*	*	*
49	22,5	624.8	462.9	300.8		Quercetina-O-dihexósido	n.i.	*	n.i.	n.i.	n.i.
50	22,7	301.1	300.8	256.9		Ácido elagico	n.i.	*	n.i.	n.i.	*
51	22,8	463.1	300.9			Quercetina-O-hexósido	*	n.i.	*	*	*
52	23,1	477.2	300.9	163.8		Quercetina-O-glucurónido	*	*	n.i.	*	*
53	23,2	449.1	284,9	302,8	177	Taxifolin-O-ramnósido	n.i.	n.i.	n.i.	*	n.i.
54	23,4	597.1	477	387,1	357	Floretina-C-diglucósido	n.i.	*	*	n.i.	n.i.
55	23,5	491.1	359.1	331		Metoxi-quercetina-O-glucósido	n.i.	n.i.	n.i.	n.i.	*
56	23,7	625.3	462.9	300.9		Quercetina-O-dihexósido	*	n.i.	*	n.i.	n.i.
57	24,1	599.2	463	301		Quercetina-hexosa-ácido protocatecuico	*	*	n.i.	*	*
58	24,3	433.2	300.9			Quercetina-O-pentósido	n.i.	*	n.i.	*	*
59	24,7	615.2	568,8	462,9	299,9	Quercetina-O-galoil hexósido	n.i.	n.i.	*	n.i.	n.i.
60	24,8	445.0	444,8	283,9		Canferol-O-hexósido	n.i.	*	*	*	n.i.
61	25,4	433.1	300.9			Quercetina-O-pentósido	n.i.	*	*	n.i.	n.i.
62	25,6	447.2	300,9			Quercetina-O-ramnósido	*	n.i.	*	*	*
63	25,5	505.2	300,8	462,9		Quercetina-O-acetil hexósido	n.i.	n.i.	n.i.	*	*
64	25,7	477.0	315			Isoramnetina-O-hexósido	*	*	*	n.i.	*
65	26,3	461.2	285			Canferol-O-glucurónido	n.i.	n.i.	n.i.	n.i.	*
66	26,7	505.3	463	300.9		Quercetina-O-acetil hexósido	*	n.i.	*	*	*
67	26,6	476.9	314,9	299,9		Isoramnetina-O-hexósido	n.i.	n.i.	*	*	*
68	27,2	613.2	463,9	300,9		Quercetina-O-galoil hexósido	n.i.	n.i.	n.i.	*	n.i.
69	26,7	463.0	300,9			Quercetina-O-hexósido	*	n.i.	n.i.	*	n.i.
70	27,3	417.4	283,9			Canferol-O-pentósido	n.i.	*	n.i.	n.i.	n.i.
71	27,5	505.2	463	300,9		Quercetina-O-acetil hexósido	n.i.	*	*	n.i.	n.i.
72	28,0	625.3	463	300.9		Quercetina-O-dihexósido	n.i.	*	*	*	*
73	28,1	479.3	316.9			Miricetina-O-hexósido	n.i.	*	*	n.i.	*
74	28,3	463.3	300.9			Quercetina-O-hexósido	*	n.i.	n.i.	n.i.	n.i.
75	28,5	505.4	300.9	487		Quercetina-O-acetil hexósido	*	n.i.	*	*	*

Tabla AIII. Continuación

#	RT [min]	[M-H] [m/z]	Fragmentos [m/z]		Identificación tentativa	EEA 14-4	EEA 19-1	EEA 19-1ha	EEA 23-2	EEA 27-1
76	28,9	475.4	432.9	300	Luteolina-metil eter-O-glucuronido	n.i.	*	n.i.	n.i.	n.i.
77	29,6	645.4	627,3	478,9	316 Galoilmetil-miricetina-hexósido	n.i.	*	*	n.i.	*
78	28,9	431.2	284.9		Canferol-O-ramnósido	n.i.	n.i.	*	*	*
79	30,3	609.5	463.1	301.1	Quercetina-O-ramnosil-O-hexósido	n.i.	*	*	*	*
80	30,7	639.4	463	300.9	Isoramnetina-O-dihexósido	*	*	*	*	n.i.
81	31,4	609.4	463	301	Quercetina-O-ramnosil-O-hexósido	*	*	n.i.	*	n.i.
82	32,0	593.4	447	284.9	Canferol-O-ramnosil hexósido	n.i.	*	*	*	*
83	32,2	609.4	462.8	300.9	446,9 Quercetina-O-rhamnosylhexósido	n.i.	*	n.i.	n.i.	n.i.
84	32,3	331.0	315.8	178.8	Miricetina metil eter	n.i.	n.i.	n.i.	n.i.	*
85	32,4	301.0	178.9	150.9	Quercetina	*	*	*	*	*
86	33,5	595.3	433.9	286.9	Eriodictiol-O-rutinosido	*	n.i.	n.i.	n.i.	n.i.
87	35,8	593.4	444,9	300,8	Canferol-metil-eter-O-pentósido-hexósido	n.i.	n.i.	*	n.i.	n.i.
88	32,4	623.5	476.9	314.9	Isoramnetina-O-rutinosido	n.i.	*	n.i.	n.i.	*
89	32,9	331.1	315,8	178,8	Miricetina metil eter	n.i.	n.i.	*	n.i.	*
90	33,9	301.2	300,8	178,8	150,8 Elagico ácido	*	n.i.	n.i.	*	n.i.
91	36,2	285.2	284,8	239,7	150,8 Canferol	n.i.	*	*	n.i.	n.i.
92	36,5	315.2	314,9	300	Isoramnetina	n.i.	*	*	*	*

Tabla AIII. Continuación