

**Caracterización farmacológica del efecto vasodilatador de extractos de bayas de calafate y de sus tres principales antocianinas glicosiladas**

**Calfio, C.**<sup>1</sup>; Huidobro-Toro, JP<sup>1</sup>.

cdp.calfio@gmail.com; juan.garcia-huidobro@usach.cl

Laboratorio de Farmacología, Facultad de Química y Biología, Universidad de Santiago de Chile<sup>1</sup>.

**Resumen**

Calafate (*Berberis microphylla*) es una planta nativa de la Patagonia de Chile y Argentina, sus bayas son de color púrpura oscuro y posee la mayor capacidad antioxidante entre frutas comerciales y endémicas de Chile. Las bayas tienen alto contenido de compuestos fenólicos que incluyen varias antocianinas, flavonoles y ácidos fenólicos. Dado que la etnomedicina une las bayas chilenas con un efecto clínico benéfico, propusimos que los extractos de bayas de calafate tienen propiedades vasodilatadoras relacionadas a la variada naturaleza de sus compuestos. Con este propósito, extractos hidroalcohólicos de calafate (0.1-300 µg/mL) y 3 principales antocianinas glicosiladas (1nM-10 µM), fueron evaluadas en la red vascular mesentérica de rata previa contracción con noradrenalina, se determinó la dependencia del endotelio y producción de óxido nítrico. Extractos de calafate inducen una respuesta dilatadora concentración-dependiente (EC<sub>50</sub> 3.7 µg/mL); la respuesta máxima de vasodilatación (75-80%) se alcanzó con 10-30 µg/mL. La vasodilatación fue significativamente reducida por la remoción del endotelio (saponina 0.1%) (70 a 30%) e inhibición de eNOS con 150 µM de L-NNA (70 a 10%).

El perfil químico del extracto (HPLC-ESI-MS/MS) identificó delfinidina (D3G), petunidina y malvidina como 3-glucósidos, las principales antocianinas del extracto. Las 3 antocianinas provocaron una relajación vascular endotelio-dependiente con diferente potencia y similar eficacia (40-50%). La principal antocianina D3G es más potente pero menos efectiva que los extractos de calafate, lo cual explica parcialmente que otros compuestos no antocianos del extracto enmascaran la respuesta inducida por D3G pero incrementan la eficacia del extracto.

**Palabras clave:** Bayas de calafate, vasodilatación, endotelio, NO, antocianinas glicosiladas.

## Introducción

El calafate (*Berberis microphylla*) es un arbusto espinoso de flores amarillas y frutos púrpura oscuro que crece extensamente en la Patagonia de Chile y Argentina (Ruiz et al. 2010; Ruiz et al. 2014b; Manosalva et al. 2016). Los frutos (bayas) de calafate se caracterizan por el alto contenido en ácido ascórbico (74 mg/100 g) y compuestos fenólicos que incluyen varias antocianinas, flavonoles, flavanoles y ácidos fenólicos (Ruiz et al. 2010; Mariangel et al. 2013; Ruiz et al. 2013a; Brito et al. 2014; Ruiz et al. 2014b; Ramírez et al. 2015). Estos compuestos le otorgan una gran capacidad antioxidante con respecto a otras bayas y frutas de interés comercial como arándanos, maqui, murta entre otros (Ruiz et al. 2010; Speisky et al. 2012; Brito et al. 2014). En este sentido, las bayas de calafate se distinguen por su alto contenido en antocianinas; que se ha mostrado al menos 20 tipos (Ruiz et al. 2010; Brito et al. 2014), siendo delfinida, petunidina y malvidina en su forma 3-glucósido las más abundantes (Ruiz et al. 2010; Ruiz et al. 2013a; Reyes-Farias et al. 2015). Del mismo modo se han identificado otros flavonoides como quercetina, miricetina, isoramnetina, catequina y epicatequina (Ruiz et al. 2010; Mariangel et al. 2013; Ruiz et al. 2014b; Brito et al. 2014; Ramírez et al. 2015), siendo quercetina-3-rutinósido, quercetina-3-galactósido e isoramnetina-3-rutinósido los predominantes (Ruiz, et al. 2014b). Por otra parte, también se ha evidenciado al menos 20 compuestos derivados de ácidos hidroxicinámicos con una concentración promedio de 4.2  $\mu\text{mol/g}$ , que es hasta 1,5 veces más altos que los de otras bayas ampliamente consumidas (Ruiz, et al. 2013b; Ruiz et al. 2014a). Estas propiedades convierten a calafate en una fruta interesante desde el punto de vista biotecnológico debido a las propiedades biológicas que puedan derivar de la variada naturaleza fitoquímica de sus compuestos, dado que son los frutos con los más altos niveles de antocianinas (~200.2 mg/100g peso fresco) (Brilo et al. 2014) y ácidos fenólicos, sobrepasando a otras bayas de gran consumo como maqui (~135 mg/100 g peso fresco) (Romanucci et al. 2016) y sus variedades nativas que crecen en las mismas zonas (Ruiz et al. 2013a), talvez por los inusuales compuestos fenólicos que la constituyen en comparación a otras bayas.

No obstante, esta característica química son escasos los estudios acerca de las propiedades biológicas y/o farmacológicas de esta baya, sin embargo, en la actualidad destacan estudios in vitro de sus propiedades como antioxidantes en eritrocitos humanos al inhibir la lipoperoxidación (Ramírez et al. 2015) así como también por su capacidad de inhibir la respuesta inflamatoria ocasionada por la interacción patogénica entre adipocitos y macrófagos, que se asocian con la obesidad (Reyes-Farias et al. 2015). No hay evidencia

científica acerca de las propiedades cardiovasculares que puedan derivar del fruto de calafate.

Los berries son la mejor fuente alimenticia de compuestos bioactivos (BAC), principalmente compuestos fenólicos (ácidos fenólicos, antocianinas, flavonoles, y taninos) y ácido ascórbico (Skrovankova et al. 2015). Además de su sabor, las bayas tienen importancia económica debido a sus propiedades antioxidantes, de gran interés por la posibilidad de usar BAC como ingredientes funcionales y nutraceuticos (Skrovankova et al. 2015). Estos compuestos, ya sea individualmente o combinados, son responsables de varios de los beneficios para la salud que se han atribuidos a las bayas (Skrovankova et al. 2015). En la actualidad el consumo regular de frutas como “berries” se ha vuelto importante en la promoción de la salud de la población, debido principalmente a las altas concentraciones de compuestos fenólicos antioxidantes que han sido asociados con la protección frente a diferentes tipos de cáncer, como anti-inflamatorio, gastroprotector, antimicrobiano entre otros (Ruiz et al. 2013a). Del mismo modo numerosos estudios sugieren que el consumo de frutas y bebidas enriquecidas en compuestos fenólicos antioxidantes reducen el riesgo de desarrollo y/o progresión de enfermedades cardiovasculares (Romanucci et al. 2016) al mejorar la función endotelial y el tono vascular (Del Bo' et al. 2012). En este sentido, flavonoides y estilbenos han sido ampliamente estudiados por sus propiedades vasodilatadoras y antioxidantes, donde kaempferol, quercetina y resveratrol han sido los principales blancos de estudio para la prevención y/o tratamiento de la hipertensión y otras enfermedades vasculares (Gao et al. 2009).

En relación con la acción vasodilatadora, se han propuesto distintos mecanismos para explicar el efecto de los polifenoles: aumento de expresión de de la óxido nítrico sintasa endotelial (eNOS), modulación del factor de transcripción KLF-2 (Martínez-Fernández et al. 2015), aumento del  $Ca^{+2}$  intracelular (Elías et al. 2011), vasodilatación por activación de plaquetas (Carnevale et al. 2014). Sin embargo, uno de los principales mecanismos por los que se piensa que los flavonoides de la dieta participan en enfermedades cardiovasculares es a través de la protección de la bioactividad del óxido nítrico (NO) derivado de endotelio, ejerciendo acciones complejas en la síntesis y biodisponibilidad de NO (Duarte et al. 2014). El óxido nítrico inhibe la contracción y crecimiento del músculo liso, la agregación plaquetaria y la adhesión de leucocitos, por lo tanto, es crítico en el mantenimiento funcional del endotelio (Del Bo' et al. 2012). En tejidos intactos sanos, algunos flavonoides aumentan la actividad de eNOS en células endoteliales (Duarte et al. 2014). Paradójicamente este efecto involucra un efecto pro-oxidante que resulta en la activación de eNOS dependiente-

Ca<sup>+2</sup> (Duarte et al. 2014). Del mismo modo pueden modificar la actividad de eNOS vía PI3K/Akt y evitar la sobreexpresión de enzimas generadoras de especies reactivas de oxígeno (ROS), al reducir los niveles de superóxido y peroxinitrito, previniendo así el desacoplamiento de eNOS y la inactivación de NO (Duarte et al. 2014). Se ha sugerido, además, que los polifenoles como resveratrol pueden ejercer su efecto vasodilatador de dos maneras: endotelio-dependiente y endotelio-independiente; este último mediante la apertura de canales de K<sup>+</sup> para la hiperpolarización del músculo liso vascular y por la atenuación de la entrada de Ca<sup>+2</sup> extracelular y liberación de Ca<sup>+2</sup> intracelular que conllevan a la vasodilatación (Shen et al. 2013). Efectos que son dependiente de las concentraciones de polifenoles, mientras una concentración baja favorece la dilatación endotelio-dependiente, concentraciones altas inducen dilatación endotelio-independiente (Shen et al. 2013). Dado que los flavonoides pueden tener diferentes blancos farmacológicos, el efecto final dependerá entonces su naturaleza química, concentración y el tipo celular que se estudie.

Considerando estos antecedentes y las propiedades que puedan derivar de los compuestos bioactivos del fruto de calafate, se hace necesario mayores estudios que consigan apoyar sus beneficios y potenciales terapéuticos como fruta funcional por sobre otras bayas de gran potencial económico e interés biotecnológico. Este se centra en la evaluación de extractos bioactivos, que concentren sus fitonutrientes mayoritarios con efectos farmacológicos demostrables. Se evaluará el efecto individual de sus moléculas principales, que puedan derivar de sus propiedades farmacológicas para ser utilizados en la elaboración de productos funcionales y nutracéuticos, de interés biotecnológico.

## **Objetivos**

1. Evaluar el efecto vasodilatador de extractos de bayas de calafate en la red arterial mesentérica de ratas con o sin endotelio, y determinar los mecanismos de señalización involucrados.
2. Identificar y caracterizar químicamente los principales compuestos del extracto
3. Analizar el efecto vasodilatador de los compuestos bioactivos mayoritarios del extracto de calafate en redes vasculares con y sin endotelio.

## **Materiales y Métodos**

### **Preparación del extracto de calafate**

Bayas de Calafate fueron colectadas en enero de 2015 en una localidad cercana a Temuco (38°S, Chile); las frutas se limpiaron y mantuvieron a -80°C hasta su análisis. Posteriormente, las bayas fueron liofilizadas; 80 g de fruta seca fue pulverizada en un mortero y se maceraron en etanol/agua/ácido acético (50:49.5:0.5 v/v). La mezcla fue homogenizada por 24 horas a temperatura ambiente en oscuridad bajo agitación constante. Luego se concentró a presión reducida en un rotavapor a 40°C, seguida de una liofilización. El polvo resultante se almacenó a -20°C hasta su uso para los estudios biológicos y químicos propuestos.

### **Identificación química del extracto por LC-MS**

10 mg de extracto fue disuelto en 1 mL de agua milliQ y filtrado mediante una membrana PDVC (0.22 µm). Para la separación de los constituyentes del extracto, 20 µL de muestra se examinaron en un sistema LC-MS que consistió del cromatógrafo HPLC Agilent 1100 (Agilent Technologies Inc., CA-USA) acoplado al espectrómetro de masas de tipo electrospray-trampa iónica ESI-TRAP Esquire 4000 (Bruker Daltonik GmbH, Alemania). La identificación de las antocianinas del extracto se realizó de acuerdo con el método descrito por Ruiz et al. (2010) para la detección de flavonoides, el cual fue modificado de acuerdo con la columna utilizada. Para la separación HPLC se utilizó una columna Luna C18(2) 150x4.6 mm, 5 µm y 100 Å (Phenomenex Inc., CA-USA), a la salida de la cual se conectó un split que dividió el flujo hacia el detector UV y al espectrómetro de masas; se usó una fase móvil en gradiente de agua/acetonitrilo/ácido fórmico (87:3:10% v/v/v) (solvente A) y agua/acetonitrilo/ácido fórmico (40:50:10% v/v/v) (solvente B); con un flujo de 0.8 mL min<sup>-1</sup>. El proceso de ionización (nebulización) mediante electrospray se realizó a 3000 V asistido por nitrógeno como gas nebulizador a una presión de 50 psi y flujo de 10 L/min y asistido por nitrógeno como gas de secado a una temperatura de 365°C. Los cromatogramas y espectros de masas se adquirieron en polaridad positiva a 520 nm.

### **Cuantificación de los principales compuestos del extracto**

La cuantificación de antocianinas se realizó en un equipo Waters Alliance 2695 equipado con un módulo de separación W2690/5, un detector DAD detector y una columna C18 Waters Spherisorb 4.6 x 150 mm, 5 µm a 40°C. La separación cromatográfica se llevó a cabo usando las mismas condiciones que LC-MS. Mediante una calibración externa con

estándares puros de antocianinas glicosiladas adquiridos de Extrasynthese (Genay, France) se realizó la cuantificación de los antocianos presentes en el extracto. Soluciones stock de todos los estándares fueron preparados en metanol-HCl 0.1%, diferentes diluciones del stock fueron preparadas en rangos de 0.01 a 0.2 mM; áreas de los peaks versus concentraciones fueron obtenidos para obtener curvas de calibración de cada compuesto ( $R^2=0.99$ ). Los resultados se expresaron como miligramos de compuesto por gramo de extracto.

### **Ensayos de reactividad vascular y cuantificación de la respuesta vasodilatadora**

Como modelo de experimentación, se usó la red vascular de ratas machos Sprague-Dawley (200-300g). Las ratas fueron anestesiadas con una i.p de ketamina (75 mg/kg)-xilacina (5 mg/kg). Enseguida se escindió la cavidad abdominal en la línea media; la arteria mesentérica superior fue canulada con un tubo de polietileno y perfundida con un flujo de 2 mL/min con buffer Krebs-Ringer equilibrada con 95% O<sub>2</sub>/5% CO<sub>2</sub> a 37°C mediante una bomba peristáltica. La red arterial mesentérica aislada fue transferida a una placa diseñada especialmente para colectar el líquido de perfusión. Un transductor de presión fue conectado en la entrada de la arteria mesentérica superior y acoplado un polígrafo para registrar los cambios en la presión de perfusión inducidos por el extracto y/o compuestos. Las preparaciones fueron estabilizadas por 20 min antes de iniciar los experimentos: fluctuaciones de la presión fueron interpretadas como cambios en la resistencia de la red arterial mesentérica. Para analizar la vasodilatación, mesenterios fueron pre-contraídos con 50 µM noradrenalina (NA) para aumentar la presión de perfusión en 30-45 mmHg, una condición necesaria para evaluar respuestas vasodilatadoras. Cada protocolo se inició con la perfusión de 1 µM acetilcolina (ACh) como control de la respuesta vasodilatadora endotelio-dependiente. Para los ensayos, el extracto liofilizado fue reconstituido en agua destilada (50 mg/mL) y a continuación diluido en el buffer de perfusión, el mismo procedimiento se siguió para los compuestos puros (stock de 1mM y 6mM). Tres tipos de experimentos se siguieron para determinar la actividad del extracto y evaluar su mecanismo de acción: i) potencia de la respuesta vascular y acción mimética de estándares comerciales de antocianinas glicosiladas, ii) determinación de los mecanismos de acción en preparaciones sin endotelio e inhibición de eNOS, iii) detección del óxido nítrico liberado.

### **Rol del endotelio y eNOS en la respuesta vasodilatadora**

Para evaluar el rol del endotelio en la respuesta vascular inducida por 10 µg/mL de extracto, mesenterios fueron perfundidos con 0.1% saponina por 90 segundos para remover una porción sustancial del endotelio sin dañar el musculo liso vascular adyacente. La ausencia de endotelio fue evidenciada por la reducción en la respuesta vasodilatadora inducida por ACh, comparada a su respuesta previa remoción. Los resultados fueron expresados como porcentaje de dilatación inducido por el extracto o compuesto antes y después de remover el endotelio. Al menos 4 mesenterios fueron examinados para este protocolo.

La participación de eNOS en la respuesta dilatadora inducida por el extracto y antocianinas fue evaluada en mesenterios antes y después de la incubación por 1 h con 150 µM Nw-nitro-L-arginine (L-NNA). Seguida de la remoción del endotelio y/o bloqueo de eNOS, la concentración de NA usada para contraer el tejido fue reducida de 50 a 3 µM; luego la respuesta del extracto o compuesto se evaluó como se indicó previamente.

### **Determinación y cuantificación del óxido nítrico**

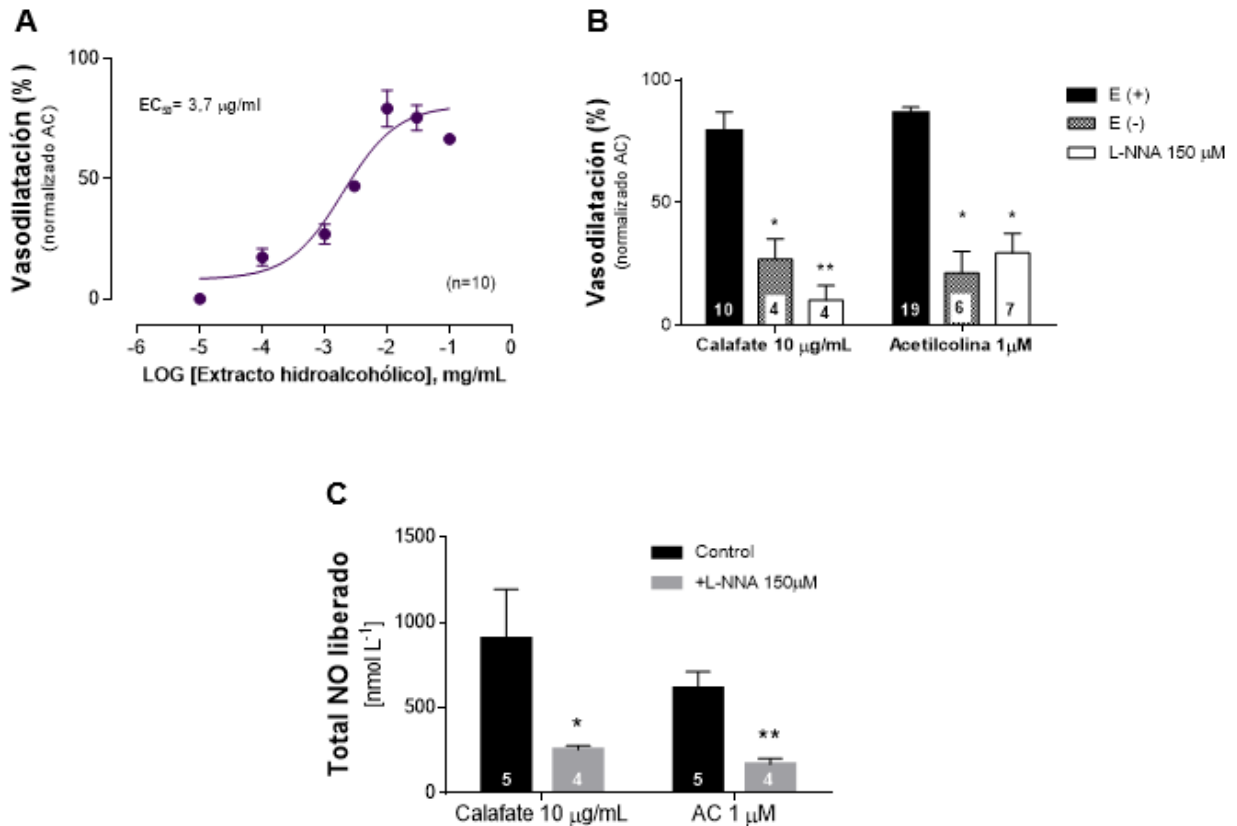
La liberación de NO se determinó en mesenterios sin pre-contracción, para evitar la interferencia debido a la liberación de NO provocada por el “shear estrés”. Para determinar el NO liberado al perfusado, se colectaron muestras cada 30 segundos, 2 min antes, durante 6 min y 5 min después de la aplicación del extracto, para examinar el retorno a los niveles basales. Un protocolo similar fue diseñado para examinar la liberación de NO inducido por el extracto en mesenterios pretratados con 150 µM L-NNA. El NO fue cuantificado por quimioluminiscencia mediante el analizador Seviens 280i NO analyser (GE Analytical Instruments, Boulder, CO, USA) de acuerdo al método previamente descrito<sup>21</sup>. Los resultados se expresaron como el curso temporal de equivalentes de NO (nmol/L) o como el NO total liberado respecto al nivel basal (nmol/L). En todos los casos, al menos 4 mesenterios fueron utilizados para cada ensayo.

### **Análisis estadístico**

El análisis y diseño de gráficos se realizó con el programa GraphPad Prism version 6.0 (San Diego, California, USA). Análisis de varianza (ANOVA) con post Bonferroni test y t-Student's se usó para comparar y determinar las diferencias estadísticas entre los grupos. Los resultados fueron expresados como el promedio ± SEM, y se consideró  $p < 0.05$  para corroborar las diferencias estadísticamente significativas.

## Resultados y Discusión

### 1. Respuesta vasodilatadora y mecanismo de acción de extractos de calafate



**Figura 1.** (A) El extracto hidroalcohólico de calafate induce una respuesta vasodilatadora concentración-dependiente en la red arterial mesentérica de rata con un EC<sub>50</sub>: 3.7 µg/mL. (B) La vasodilatación inducida por el extracto de calafate y acetilcolina (AC) fue reducida significativamente por la remoción del endotelio con saponina 0.1 % y por la inhibición de eNOS con 150 µM Nitro-L-arginina (L-NNA). (C) El extracto de calafate induce producción de óxido nítrico (NO) el cuál es inhibido por el tratamiento con L-NNA 150 µM. Las barras y símbolos indican el valor promedio ± SEM. \*P <0.05 comparado con el endotelio funcional (E+).

En la actualidad el consumo regular de frutas como berries se ha vuelto importante en la promoción de la salud de la población, debido principalmente a los altos contenidos de compuestos fenólicos antioxidantes (Romanucci et al. 2016), que se han asociado con la protección contra enfermedades cardiovasculares, diabetes, etc. Varios berries han mostrado interesantes propiedades, sin embargo, en la actualidad destaca el calafate (*Berberis microphylla*) una baya nativa de la Patagonia de Chile y Argentina que posee el



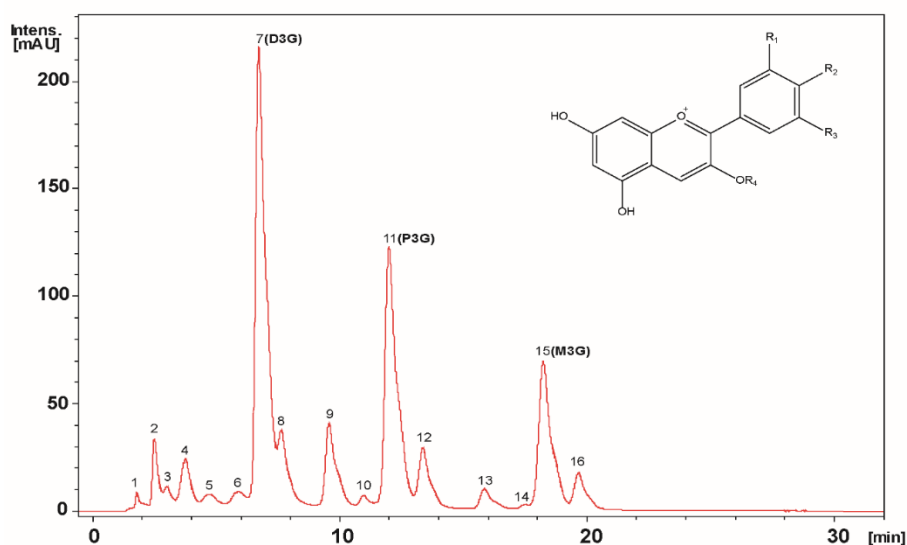
mayor perfil antioxidante entre las frutas endémicas y comerciales de Chile (Speisky et al. 2012), sin embargo, la farmacología de esta fruta ha sido escasamente investigada.

Dado que la etnomedicina relaciona las bayas chilenas del sur de Chile con efectos clínicos benéficos (antidiabéticos, antiinflamatorio asociado con la obesidad) (Reyes-Farías et al. 2016), propusimos que los extractos de bayas de calafate tienen propiedades vasodilatadoras relacionadas a la variada naturaleza química de sus compuestos.

En este estudio demostramos que el extracto de calafate induce una respuesta vasodilatadora concentración-dependiente en la red arterial mesentérica de rata (Fig. 1A), que se asocia a la producción y liberación de NO (Fig. 1C). Sin embargo, cuando se remueve el endotelio o se bloquea la actividad de eNOS, el efecto inducido por el extracto se reduce significativamente (Fig. 1B).

## 2. Caracterización química, identificación y cuantificación relativa de los principales compuestos del extracto.

De acuerdo con el perfil químico de los extractos, derivado de los análisis por HPLC-ESI-MS y cuantificación con estándares comerciales por HPLC-DAD, se logró identificar que delphinidina, petunidina y malvidina en forma 3-glucósido son las antocianinas mayoritarias del extracto, con una cantidad relativa promedio de 2-4 mg/g extracto (Tabla 1), similar a lo reportado por Ruiz et al (2013a).



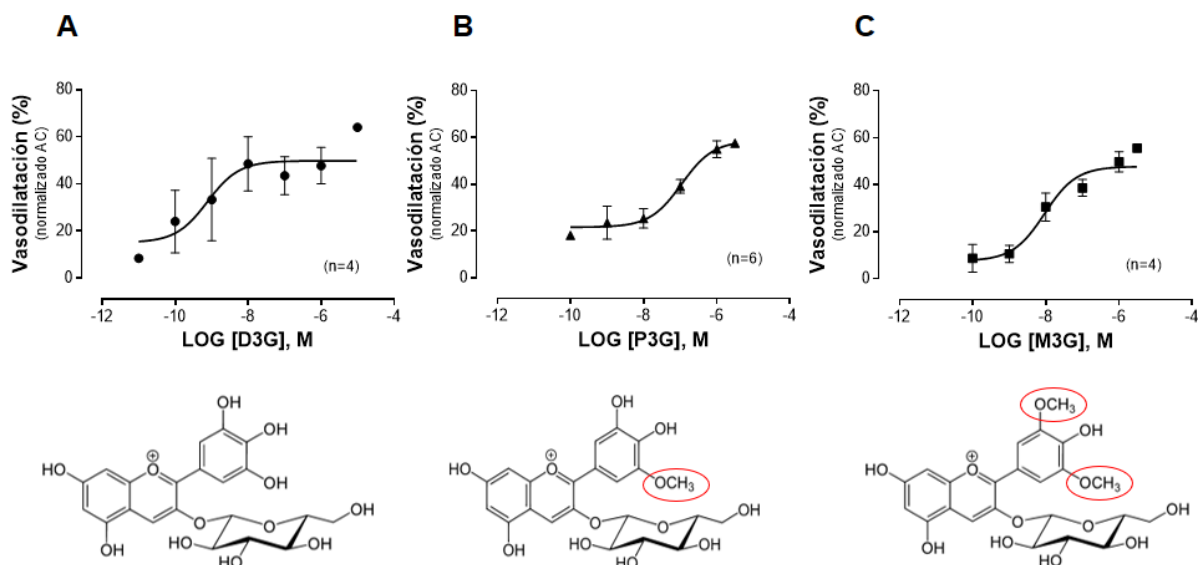
**Figura 2.** Cromatograma representativo de las antocianinas identificadas por LC-MS en el extracto de calafate.

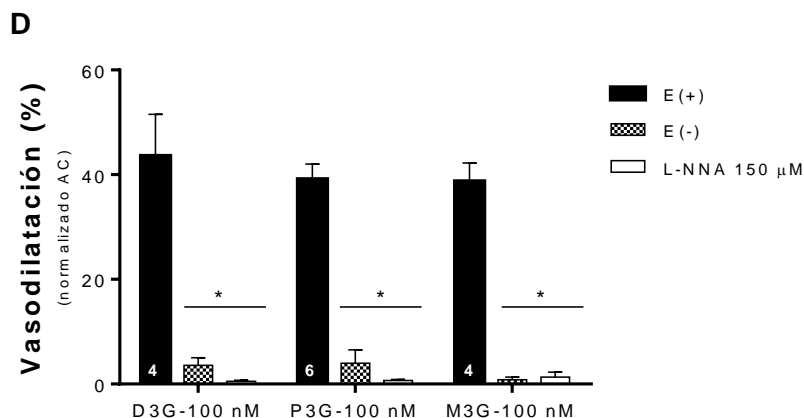
**Tabla1.** Cuantificación relativa de las principales antocianinas del extracto de calafate.

Peak	Estándares comerciales	Sustituciones	mg/g extracto
<b>Antocianinas</b>			
7	<b>D3G</b> , Delfinidina-3-glucósido	R1: OH, R2: OH, R3: OH, R4: Glucosa	4.04
8	<b>D3R</b> , Delfinidina-3-rutinósido	R1: OH, R2: OH, R3: OH, R4: Rutinosa	1.23
9	<b>C3G</b> , Cianidina-3-glucósido	R1: OH, R2: OH, R4: Glucosa	0.92
10	<b>C3R</b> , Cianidina-3-rutinósido	R1: OH, R2: OH, R4: Rutinosa	0.44
11	<b>P3G</b> , Petunidina-3-glucósido	R1: OH, R2: OH, R3: OCH <sub>3</sub> , R4: Glucosa	3.81
13	<b>Po3G</b> , Peonidina-3-glucósido	R1: OCH <sub>3</sub> , R2: OH, R4: Glucosa	0.44
15	<b>M3G</b> , Malvidina-3-glucósido	R1: OCH <sub>3</sub> , R2: OH, R3: OCH <sub>3</sub> , R4: Glucosa	2.24

Varios métodos se han utilizado para extraer antocianinas en bayas de calafate. Estos métodos se basan en la combinación de solventes más o menos polares acidificados para lograr un eficiente método de extracción, donde el más comúnmente usado es metanol (Ruiz et al. 2010; Ruiz et al. 2013a; Brito et al. 2014; Reyes-Farias et al. 2015), pese a su elevada toxicidad. En nuestro estudio, se preparó un extracto en base a etanol-agua acidificada, logrando extraer 25.3  $\mu\text{mol/g}$  de antocianinas totales, similar al contenido reportado por Ruiz et al (2013a) en extractos metanólicos acidificados (28.8  $\mu\text{mol/g}$ ).

### 3. Actividad vasodilatadora de las antocianinas mayoritarias del extracto de calafate en la red vascular mesentérica de rata.



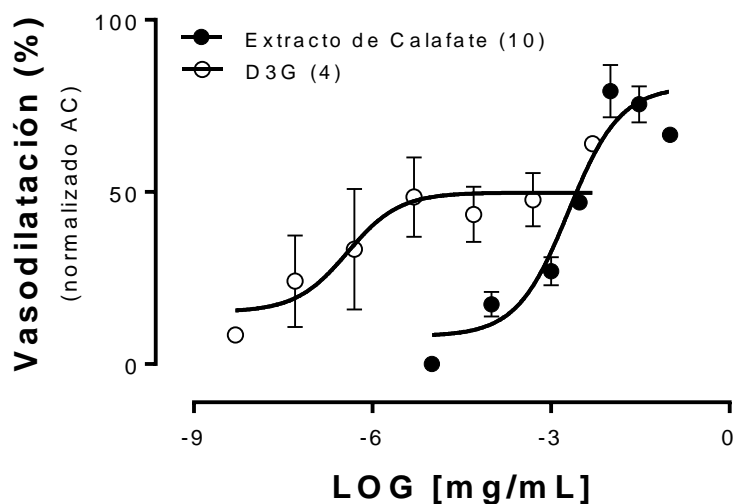


**Figura 3.** Respuesta vascular de las antocianinas mayoritarias del extracto de calafate: **(A)** Delfinidina-3-glucósido (D3G), **(B)** Petunidina-3-glucósido (P3G) y **(C)** Malvidina-3-glucósido (M3G) inducen una respuesta vasodilatadora concentración-dependiente en la red arterial mesentérica de ratas con endotelio intacto. **(D)** Rol del endotelio y eNOS: La vasodilatación inducida por las 3 antocianinas a 100 nM fue reducida significativamente por la remoción del endotelio con saponina 0.1 % (E-) y por la inhibición de eNOS con 150 μM Nitro-L-arginina (L-NNA). Los símbolos y barras indican el valor promedio ± SEM. \*P < 0.05 comparado con el endotelio funcional (E+).

Las 3 antocianinas inducen vasodilatación con similar potencia y eficacia en la red arterial mesentérica de ratas (Fig.3), su acción depende completamente del endotelio y eNOS (47% disminuye significativamente a 5 y 1%). Antocianinas como D3G y M3G son potentes vasodilatadores (comparable al control acetilcolina, datos no mostrados) pero menos eficaces que flavonoles como quercetina (menor potencia y similar eficacia a altas concentraciones respecto AC, datos no mostrados). Demostrando que la acción farmacológica se asociaría al tipo de flavonoide, sustituciones presentes en la molécula.

#### 4. Comparación de la respuesta dilatadora entre el extracto y su principal antocianina glicosilada.

El extracto de calafate induce menor potencia vasodilatadora pero mayor efecto máximo cuando se compara con el compuesto mayoritario D3G (Fig.4), resultados que explican parcialmente que otros compuestos no antocianos presentes en el extracto enmascaran la respuesta inducida por D3G pero incrementan la eficacia del extracto. Por lo tanto, es factible que otros constituyentes del extracto, como quercetina y sus derivados glicosilados muestren un efecto sinérgico y/o aditivo si se administran conjunto a las antocianinas, de acuerdo a lo demostrados en este estudio.



**Figura 4.** Comparación entre la respuesta vasodilatadora del extracto de calafate y su antocianina mayoritaria (D3G). El extracto tiene mayor eficacia, pero menos potencia vascular que D3G ( $EC_{50}$ : 3,7 v/s 0,32  $\mu$ g/mL –  $E_{m\acute{a}x}$ :81,9 v/s 56,9 %), en mesenterios con endotelio intacto. Los s\u00edmbolos representan el valor promedio  $\pm$  SEM.

### Conclusiones

El extracto de bayas de calafate induce una respuesta dilatadora endotelio-dependiente asociada a la producci\u00f3n de NO.

Nuestros hallazgos demuestran que las antocianinas glicosiladas del extracto son bioactivas. D3G, P3G y M3G tienen un efecto dilatador endotelio-dependiente que solo alcanzan un 50 % de vasodilataci\u00f3n.

Las propiedades vasculares del extracto de calafate se asocian parcialmente a sus compuestos bioactivos mayoritarios, debido a su menor potencia y mayor eficacia. Por tanto, existen otros constituyentes del extracto que contribuyen con su respuesta biol\u00f3gica.

### Bibliograf\u00eda

Brito, A., Areche, C., Sep\u00falveda, B., Kennelly, E and Simirgiotis, M. 2014. Anthocyanin Characterization, Total phenolic quantification and antioxidant features of some Chilean edible berry extracts. *Molecules* 19 (8): 10936–55.

Carnevale, R., Loffredo, L., Nocella, C., Bartimoccia, S., Bucci, T., De Falco, E., Peruzzi, M., Chimenti, I., Biondi-Zoccai, G., Pignatelli, P., Violi, F and Frati, G. 2014. Epicatechin and catechin modulate endothelial activation induced by platelets of patients with peripheral artery disease. *Oxid. Med. Cell. Longev.* 2014, 1–9

Del Bo', C., Kristo, A.S., Kalea, A.Z., Ciappellano, S., Riso, P., Porrini, M and Klimis-Zacas, D. 2012. The temporal effect of a Wild Blueberry (*Vaccinium Angustifolium*)-enriched diet on vasomotor tone in the Sprague-Dawley rat. *Nutrition, Metabolism and Cardiovascular Diseases* 22 (2). Elsevier Ltd: 127–32.

Duarte, J and Tamargo, J. 1993. Vasodilatory Effects of Flavonoids in Rat. *General Pharmacology*, 24(4), 857–862

Elfés, J., Cuiñas, A., García-Morales, V., Orallo, F and Campos-Toimil, M. 2011. Trans-resveratrol simultaneously increases cytoplasmic Ca<sup>2+</sup> levels and nitric oxide release in human endothelial cells. *Mol. Nutr. Food Res.* 55, 1237–1248.

Gao, X., Wang, W., Wei, S., and Li, W. 2009. Vasorelaxant effect of stilbenes from rhizome extract of rhubarb (*Rheum undulatum*) on the contractility of rat aorta. *Zhongguo Zhong Yao Za Zhi* 34, 2695–2700.

Manosalva, L., Mutis, A., Urzúa, A., Fajardo, V and Quiroz, A. 2016. Antibacterial activity of alkaloid fractions from *Berberis microphylla* G. Forst and study of synergism with ampicillin and cephalothin. *Molecules* 21 (1): 76.

Mariangel, E., Reyes-Diaz, M., Lobos, W., Bensch, E., Schalchli, H and Ibarra, P. 2013. The antioxidant properties of calafate (*Berberis microphylla*) fruits from four different locations in Southern Chile. *Ciencia e Investigación Agraria* 40 (1): 161–70.

Martínez-Fernández, L., Pons, Z., Margalef, M., Arola-Arnal, A and Muguerza, B. (2015) Regulation of vascular endothelial genes by dietary flavonoids: structure-expression relationship studies and the role of the transcription factor KLF-2. *J. Nutr. Biochem.* 26, 277–284.

Ramírez, J.E., Zambrano, R., Sepúlveda, B., Kennelly, E.J and Simirgiotis, M. J. 2015. Anthocyanins and antioxidant capacities of six Chilean berries by HPLC–HR-ESI-ToF-MS. *Food Chemistry* 176 (June). Elsevier Ltd: 106–14.

Reyes-Farias, M., Vásquez, K., Ovalle-Marín, A., Fuentes, F., Parra, C., Quitral, V., Jiménez,

P and García-Díaz, DF. 2015. Chilean native fruit extracts inhibit inflammation linked to the pathogenic interaction between adipocytes and macrophages. *Journal of Medicinal Food* 18 (5): 601–8.

Romanucci, V., D'Alonzo, D., Guaragna, A., Di Marino, C., Davinelli, S., Scapagnini, G., Di Fabio, G and Zarrelli, A. 2016. Bioactive compounds of *Aristotelia chilensis* Stuntz and their pharmacological effects." *Current Pharmaceutical Biotechnology* 17 (6): 513–23.

Ruiz, A., Hermosín-Gutiérrez, I., Mardones, C., Vergara, C., Herlitz, E., Vega, M., Dorau, C., Winterhalter, P and von Baer, D. 2010. Polyphenols and antioxidant activity of calafate (*Berberis microphylla*) fruits and other native berries from Southern Chile. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 58 (10): 6081–89.

Ruiz, A., Hermosín-Gutiérrez, I., Vergara, C., von Baer, D., Zapata, M., Hitschfeld, A., Obando, L and Mardones, C. 2013a. Anthocyanin profiles in South Patagonian wild berries by HPLC-DADESI-MS/MS. *Food Research International* 51 (2): 706–13.

Ruiz, A., Mardones, C., Vergara, C., Hermosín-Gutiérrez, I., von Baer, D., Hinrichsen, P., Rodríguez, R., Arribillaga, D and Dominguez, E. 2013b. Analysis of hydroxycinnamic acids derivatives in calafate (*Berberis microphylla* G. Forst) berries by Liquid Chromatography with Photodiode Array and Mass Spectrometry detection." *Journal of Chromatography A* 1281 (March). Elsevier B.V.: 38–45.

Ruiz, A., Mardones, C., Vergara, C., von Baer, D., Gómez-Alonso, S., Gómez, M. V and Hermosín-Gutiérrez, I. 2014a. Isolation and structural elucidation of anthocyanidin 3,7- $\beta$ -O-diglucosides and caffeoyl-glucaric acids from Calafate berries. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 62 (29): 6918–25.

Ruiz, A., Zapata, M., Sabando, C., Bustamante, L., von Baer, D., Vergara, C and Mardones, C. 2014b. Flavonols, alkaloids, and antioxidant capacity of edible Wild *Berberis* species from Patagonia. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 62 (51): 12407–17.

Shen, M., Zhao, L., Wu, R., Yue, S and Pei, J. 2013. The vasorelaxing effect of resveratrol

on abdominal aorta from rats and its underlying mechanisms. *Vascular Pharmacology* 58 (1-2): 64–70.

Skrovankova, S., Sumczynski, D., Mlcek, J., Jurikova, T and Sochor, J. 2015. Bioactive compounds and antioxidant activity in different types of berries. *International Journal of Molecular Sciences* 16 (10): 24673–706.

Speisky, H., López-Alarcón, C., Gómez, M., Fuentes, J and Sandoval-Acuña, C. 2012. First WebBased Database on total phenolics and oxygen radical absorbance capacity (ORAC) of fruits produced and consumed within the South Andes Region of South America. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 60 (36): 8851–59.

### **Financiamiento**

Esta investigación fue financiada por el proyecto FONDECYT 117-0842 y la Beca CONICYT de Doctorado Nacional, N°21141226.