



UNIVERSIDAD DE CONCEPCIÓN
FACULTAD DE FARMACIA

**CARACTERIZACIÓN QUÍMICA Y BIOLÓGICA DE
EXTRACTOS DE HOJAS Y FRUTO DE CALAFATE PARA LA
EVALUACIÓN DE SU EFECTO SOBRE ESTRÉS OXIDATIVO,
Y EN MODELO ANIMAL SOMETIDO A UNA PAUTA DE
EJERCICIO AERÓBICO**

TESIS PRESENTADA A LA FACUTAD DE FARMACIA PARA OPTAR AL GRADO
ACADÉMICO DE DOCTOR EN CIENCIAS Y TECNOLOGÍA ANALÍTICA

POR: DANIELA ALEJANDRA GERTRUDRIS NOVA BAZA
PROFESOR GUÍA: DRA. CLAUDIA MARDONES PEÑA
PROFESOR CO-GUÍA: DR. JORGE FUENTEALBA ARCOS
CONCEPCIÓN, CHILE, 2023

A Rafael, mi fuente de energía, alegría y amor.

Tabla de Contenidos

Índice de figuras	vi
Índice de tablas	xi
RESUMEN.....	XIII
CAPÍTULO 1 INTRODUCCIÓN	1
1.1 Estrés oxidativo y especies reactivas del oxígeno (ROS)	1
1.2 Estrés oxidativo, y enfermedades asociadas	5
1.3 Ejercicio y estrés oxidativo	7
1.4 Costos asociados a la inactividad física	11
1.5 Alimentación, estrés oxidativo.....	12
1.6 Calafate, <i>Berberis microphylla</i> G. Forst	15
1.7 Compuestos fenólicos	18
1.7.1 Ácidos hidroxicinámicos.....	22
1.7.2 Antocianinas.....	23
1.8 Metabolización de los compuestos fenólicos.....	26
1.8.1 Compuestos fenólicos y estrés oxidativo	26
1.8.2 Biodisponibilidad de los compuestos fenólicos.....	27
1.9 Técnicas analíticas modernas para el análisis de compuestos fenólicos en un modelo animal.	34
CAPÍTULO 2 HIPOTESIS Y OBJETIVOS	43
2.1 Hipótesis.....	43
2.2 Objetivo principal.....	43

2.3	Objetivos específicos	44
2.3.1	<i>Caracterizar el potencial bioactivo del calafate (hoja y fruto) para su potencial uso en modelo desarrollado de intervención de animales in vivo</i>	44
2.3.2	<i>Diseñar y desarrollar un modelo de intervención de animales in vivo, basado en una pauta de ejercicio y consumo de compuestos fenólicos, para evaluar cambios sobre el perfil metabólico en plasma de los animales.</i>	44
2.3.3	<i>Realizar intervención nutricional y de ejercicio aeróbico usando modelo desarrollado de intervención de animales in vivo</i>	44
CAPÍTULO 3 ESTRATEGIA ANALÍTICA		45
3.1	Caracterización de hojas de Berberis	45
3.2	Análisis de una infusión de calafate.....	46
3.3	Obtención de un Modelo de estudio para evaluar el efecto de un extracto rico en polifenoles y ejercicio aeróbico regular sobre el estrés Oxidativo.....	48
3.3.1	<i>Obtención de un extracto de calafate rico en polifenoles.....</i>	49
3.3.2	<i>Obtención modelo murino de entrenamiento aeróbico.....</i>	50
3.3.3	<i>Obtención de modelo murino para evaluar efecto sinérgico de la dieta y el ejercicio</i>	52
3.3.4	<i>Obtención de muestras a partir de animales intervenidos</i>	53
3.4	Análisis estadístico.....	54
CAPÍTULO 4 RESULTADOS		55
4.1	Objetivo 1.....	55
4.1.1	<i>Artículo 1</i>	55
4.1.2	<i>Artículo 2</i>	79
4.2	Objetivo 2 y 3.....	125

Análisis preliminar del impacto de una dieta suplementada con extracto de Calafate y Ejercicio Aeróbico regular en el metaboloma de un modelo murino de estrés oxidativo.....	126
Resumen	126
4.2.1 <i>Introducción</i>	128
4.2.2 <i>Materiales y métodos</i>	133
4.2.2.1 Obtención de un extracto de calafate	133
4.2.2.2 Evaluación efecto del extracto de calafate en modelos celulares	134
4.2.2.3 Actividad espontánea en neuronas Hipocampales	137
4.2.2.4 Diseño experimental de la intervención con animales	138
4.2.2.5 Intervención nutricional.....	139
4.2.2.6 Entrenamiento	140
4.2.2.7 Obtención de muestras de plasma, cerebro e hipocampo	142
4.2.2.8 Protocolos de extracción para evaluación de los metabolitos	143
4.2.2.9 Métodos HPLC-ESI-QTOF-MS/MS para el análisis de las distintas muestras.	144
4.2.2.10 Estrategia analítica para análisis de metabolitos en muestras biológicas	148
4.2.2.11 Análisis y procesamiento de datos.....	149
4.2.3 <i>Resultados</i>	156
4.2.3.1 Efecto del extracto de calafate sobre viabilidad de células PC-12.....	156
4.2.3.2 Efecto del extracto de calafate en actividad neuronal aguda	158
4.2.3.3 Ensayo animal	161
4.2.3.4 Análisis visual	163
4.2.3.5 Análisis a través de estrategia metabolómica	177

CAPÍTULO 5 DISCUSIÓN 192

5.1 Efecto del extracto de calafate en modelos celulares.....	192
5.2 Efecto del calafate y el ejercicio sobre el peso de los animales.....	193
5.3 Análisis visual de metabolitos.....	195

5.4	Análisis a través de la estrategia metabolómica.....	199
CAPÍTULO 6	CONCLUSIONES.....	205
REFERENCIAS	210

Índice de figuras

Figura 1.1 Metabolismo de algunas ROS y reacciones involucradas en la lipoperoxidación. a) Formación de anión superóxido ($O_2^{\bullet-}$) [1] y peróxido de hidrógeno (H_2O_2) [2] a partir de O_2 ; b) Eliminación de H_2O_2 mediante enzimas antioxidantes, catalasa [3] y glutatión peroxidasa [4]; c) Reacciones implicadas en la lipoperoxidación lipídica, formación del radical hidroxilo ($\bullet OH$) a través de la reacción Fenton [5], la reacción $\bullet OH$ con lípidos insaturados, formando radicales libres de lípidos ($\bullet L$) [6], y la propagación de la peroxidación lipídica [7] [8]. ^{5,7}	3
Figura 1.2 Dualidad de los efectos provocados por H_2O_2 en el metabolismo oxidativo: Las fuentes de H_2O_2 incluyen los complejos NADPH oxidasas unidas a la membrana, o libres provenientes de la mitocondria. La función de SODs. La difusión del H_2O_2 a través de acuaporinas (AQP) conocidas como peroxiporinas. En verde las cascadas de señalización mediante estrés oxidativo fisiológico y en rojo el daño generado por un exceso de estrés oxidativo. Figura tomada y adaptada de Helmut Sies, 2017 ⁷	10
Figura 1.3 Clasificación de compuestos fenólicos. Adaptado de ⁴⁴	21
Figura 1.4 Estructura de los principales compuestos fenólicos encontrados en la naturaleza. Tomada de Liu et al.,2019 ⁵⁶	24
Figura 1.5 Esquema que representa la vía de biosíntesis de las antocianinas y las diferentes enzimas involucradas: CHS: chalcona sintasa; CHI: chalcona isomerasa; F3H: flavanona 3-hidroxilasa; F3'H: flavonoide 3'-hidroxilasa;	

F3'5'H: flavonoide 3',5'-hidroxilasa; DFR: dihidroflavonol4-reductasa; ANS: antocianidina sintasa; UFGT: flavonoide 3-O-glucosiltransferasa y FLS: flavonol sintasa. Diagrama tomado y adaptado de Liu et al., 2018 ⁶⁰	25
Figura 1.6 Metabolismo y destino de los compuestos fenólicos en la dieta. En la figura se detalla la absorción de los compuestos fenólicos, los procesos de conjugación mediante B-glucosidasas, su absorción y su transporte. Imagen tomada y adaptada de Martinez ⁴⁴	30
Figura 3.1 Estrategia analítica para la caracterización de hojas de Berberis sp.....	46
Figura 3.2 Estrategia analítica para el análisis de la infusión de calafate	48
Figura 3.3 Estrategia Analítica de obtención de extracto de calafate.	50
Figura 3.4 Resumen de modelo propuesto de intervención para la evaluación del efecto del ejercicio y el consumo de un extracto rico en compuestos fenólicos en un modelo de estrés oxidativo.	53
Figura 4.1 Modelo de evaluación del efecto del extracto de calafate en modelos celulares.....	135
Figura 4.2 Estrategia de estudio para análisis de metabolitos.....	149
Figura 4.3 A: Efecto del extracto del fruto de calafate (EC) sobre viabilidad de células PC12; B: Efecto de una solución de azúcares (Glucosa + Fructosa) sobre viabilidad de células PC12. FCCP: control de muerte celula n=3, análisis ANOVA, post hoc Tukey.....	158

Figura 4.4 Actividad espontánea de calcio en neuronas del hipocampo en presencia de extracto de calafate, una mezcla de glucosa y fructosa (G+F) y péptido A β , n > 5. ANOVA, post hoc Tukey.....	160
Figura 4.5 Cambio en el peso de los animales de estudio. Barra de la izquierda corresponde al peso inicial, barra de la derecha corresponde al peso al término del tratamiento. (ANOVA de dos vías, mediante comparación múltiple entre el promedio de cada valor dentro de la columna, Post-Hoc, test de comparación múltiple de Bonferroni's multiple (p=0.0201))	162
Figura 4.6 Cromatograma del pico base (BPC) para Método Semipolar en modo ESI positivo de todas las muestras de plasma analizadas. Azul: Grupo control; Verde: Dieta (+/-); Rojo: Ejercicio (-/+); Amarillo: Dieta + ejercicio (+/+) (n=2 para cada condición).....	164
Figura 4.7 Mecanismo de búsqueda de metabolitos diferenciadores. En la figura a) se muestra un ejemplo de la búsqueda visual en el cromatograma del pico base (BPC) donde se identificaron picos diferenciadores, luego en b) se realizó el análisis MS a tiempo 9.5 y el MSMS del ión 391.2861 m/z. En c) los datos obtenidos a través del programa DataAnalysis, en d) la identificación realizada con ayuda de las bibliotecas disponibles.....	165
Figura 4.8 Cromatogramas BPC para la metodología semipolar en muestras de plasma. Se observa el cromatograma del pico base y se realiza un zoom para identificar los picos diferenciadores.	167

Figura 4.9 Cromatograma del pico base (BPC) en modo negativo y positivo para compuestos apolares en plasma	169
Figura 4.10 Estructura del Ácido taurocólico (Imagen tomada de Pubchem), se observa la cadena lateral altamente hidrofílica por la y el anillo esteroide de comportamiento hidrofóbico.....	171
Figura 4.11 Cromatogramas BPC para la metodología polar (HILIC) en muestras de plasma. Se observa el cromatograma del pico base y se realiza un zoom para identificar los picos diferenciadores.	172
Figura 4.12 Cromatogramas BPC para muestras de cerebro a través de la metodología apolar. a) modo positivo, b) modo negativo.	176
Figura 4.13 Score Plot del PCA de las muestras de plasma procesadas mediante método polar. El eje x representa el componente principal 1 (PC1) vs el eje y que representa el componente principal 2. Se observan los QCs (verde) en el centro del gráfico, las muestras control (verde) y las muestras que consumieron calafate (rojo)	179
Figura 4.14 PCAs intervención nutricional para muestras de plasma: Se muestran los score Plot para cada metodología (polar, semipolar y apolar) en modo ESI+ y ESI-: Los parámetros para la PCA se describen en metodología. Solo el gráfico c) muestra el PC1 vs PC4 que representaba la mejor separación entre los grupos de muestra.....	181
Figura 4.15 PCAs intervención deportiva en muestras de plasma: Se muestran los score Plot para cada metodología: a) y b) metodología polar; c) y d)	

metodología semipolar; d) y e) metodología apolar, todas en modo ESI+ y ESI-. Se muestra la mejor separación entre los grupos con los PCAs correspondientes. 183

Figura 4.16 Volcano Plot y señales identificadas mediante el análisis de las BT de la intervención nutricional mediante metodología polar. 185

Índice de tablas

Tabla 1.1 Principales antioxidantes y su fuente ²⁸	14
Tabla 4.1 Composición de Antocianos, HCAs y ácidos grasos del extracto de calafate utilizado.	134
Tabla 4.2 Condiciones HPLC para distintos protocolos utilizados en análisis de muestras	146
Tabla 4.3 Condiciones MS/MS para análisis de muestras.	147
Tabla 4.4 Parámetros para generación de Bucket Table.	152
Tabla 4.5 Identificación de metabolitos a través de metodología semi-polar.	168
Tabla 4.6 Metabolitos plasmáticos identificados mediante inspección visual.	174
Tabla 4.7 Recopilado de señales obtenidos mediante Análisis Metabólico.	189

RESUMEN

El estrés oxidativo es un factor importante en el inicio de varias patologías, entre ellas enfermedades neurodegenerativas como Alzheimer y demencia senil; enfermedades cardiovasculares; cáncer entre otras. Diversos estudios indican que un estilo de vida que incluya una dieta rica en antioxidantes, ejercicio regular y vida social activa ayudarían a reducir o retardar los procesos celulares involucrados en el desarrollo de patologías asociadas al estrés oxidativo.

En la búsqueda de alimentos funcionales, nuestro grupo de investigación ha estudiado un arbusto autóctono de la patagonia chileno argentina, el calafate (*Berberis microphylla*). El calafate posee una poderosa baya, consumida desde tiempos prehispánicos que posee altos niveles de compuestos bioactivos, especialmente compuestos fenólicos. El fruto es estacional, pero la planta es perenne, por lo cual las hojas se convierten en una interesante fuente de compuestos bioactivos para evaluar su potencial como alimento funcional.

Se caracterizaron los compuestos polares y semipolares de los extractos metanólicos a través de HPLC-DAD-QTOF de cinco tipos de hojas de *Berberis*: Calafate (*Berberis microphylla*); Michay (*Berberis darwinii*);

Calafatillo o Calafate enano (*Berberis empetrifolia*); Calafate o Michay (*Berberis trigona*); y Agracejo (*Berberis vulgaris*). Se lograron identificar en total 175 metabolitos diferentes entre los cinco extractos de hojas estudiadas. Además, se evaluó su potencial antioxidante y contenido de ácidos grasos.

Posteriormente, se realizó una infusión acuosa con hojas de calafate, realizando una completa caracterización que implicó la cuantificación de los principales compuestos fenólicos presentes en la infusión, el contenido elemental, el efecto antioxidante de la infusión *in vitro*, su efecto sobre enzimas digestivas y sobre la viabilidad en modelos celulares, obteniendo resultados prometedores en

Finalmente, en este trabajo de tesis se evaluó cómo la dieta y ejercicio impacta sobre el estrés oxidativo. Para esto se desarrolló en un modelo murino de estrés oxidativo, un plan de intervención que implicó una dieta suplementada con un extracto etanólico del fruto de calafate rico en compuestos (poli)fenólicos antioxidantes, el efecto del ejercicio aeróbico regular, además se evaluó el efecto sinérgico de ambas intervenciones. Finalizando la intervención, se analizaron muestras de plasma, cerebro e hipocampo de los animales, mediante UHPLC-QTOF-MS y se identificaron posibles biomarcadores de estrés oxidativo.

Capítulo 1 Introducción

1.1 Estrés oxidativo y especies reactivas del oxígeno (ROS)

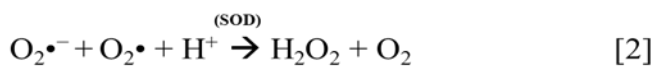
El estrés oxidativo se conoce como el desequilibrio entre la generación de prooxidantes y sus mecanismos de captación ¹, donde la producción de prooxidantes supera la capacidad de neutralización a través de mecanismos moleculares intracelulares ². Los prooxidantes más conocidos son los radicales libres (RL), los cuales se definen como entidades o fragmentos moleculares, capaces de existir de forma independiente que contienen uno o más electrones desapareados en su última capa de valencia ^{3,4}, que les proporciona gran reactividad con macromoléculas vecinas presentes en la célula, principalmente ácidos nucleicos, proteínas, y lípidos que componen membranas celulares ⁵.

Comúnmente se utiliza el término “especies reactivas del oxígeno (ROS, por sus siglas en inglés) para referirse indistintamente a los radicales libre, aunque los ROS incluyen un grupo más amplio de moléculas, donde se encuentran tanto a los radicales libres como a otras especies no radicales, como el peróxido de hidrógeno (H₂O₂) o ácido hipocloroso (HOCl), las cuales son moléculas estables, pero altamente reactivas con el oxígeno ⁴.

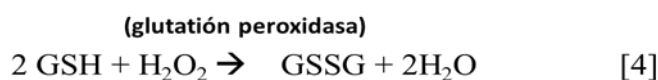
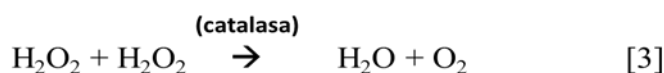
Además, en el organismo también existen moléculas derivadas del nitrógeno que reaccionan con oxígeno, denominadas especies reactivas del nitrógeno (RNS), como el óxido nítrico (NO) o el peroxinitrilo (ONOO⁻). Para englobar a ambas especies es común denominarlas RONS, aunque en el texto nos referiremos únicamente como ROS ⁴.

Las fuentes de ROS provienen de reacciones enzimáticas y no enzimáticas. Dentro de los mecanismos enzimáticos involucrados en la formación de ROS se encuentra la cadena respiratoria de electrones, la síntesis de prostaglandinas, la respuesta fagocítica (peroxisomas, liposomas) y el sistema citocromo P450 ⁶. Por otro lado, la formación de ROS de manera no enzimática puede ocurrir cuando el oxígeno reacciona con compuestos orgánicos, exposición a metales de transición (ej, Cd, Hg, Pb, As, o metales iónicos como Fe⁺² o Cu⁺) exposición a radiaciones ionizantes como los rayos X o rayos UV, ozono, contaminación ambiental, infecciones microbianas, drogas o sus metabolitos, entre otros factores ⁴

a) Producción de anión superóxido y peróxido de hidrógeno



b) Neutralización de peróxido de hidrógeno mediante enzimas antioxidantes



c) Lipoperoxidación y daño oxidativo a lípidos

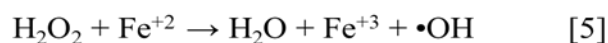


Figura 1.1 Metabolismo de algunas ROS y reacciones involucradas en la lipoperoxidación. a) Formación de anión superóxido ($\text{O}_2^{\bullet-}$) [1] y peróxido de hidrógeno (H_2O_2) [2] a partir de O_2 ; b) Eliminación de H_2O_2 mediante enzimas antioxidantes, catalasa [3] y glutación peroxidasa [4]; c) Reacciones implicadas en la lipoperoxidación lipídica, formación del radical hidroxilo ($\bullet\text{OH}$) a través de la reacción Fenton [5], la reacción $\bullet\text{OH}$ con lípidos insaturados, formando radicales libres de lípidos ($\bullet\text{L}$) [6], y la propagación de la peroxidación lipídica [7] [8].^{5,7}

La Figura 1.1 describe algunas reacciones que generan ROS en el metabolismo celular ⁵. La formación del radical anión superóxido ($O_2^{\bullet-}$) a través del complejo I (NADH) o el complejo III (citocromo c) de la cadena transportadora de electrones se puede representar mediante la ecuación [1], y se considera el primer radical enzimático formado. Luego, el anión superóxido puede ser catalizado a peróxido de hidrógeno (H_2O_2) y oxígeno molecular por la enzima superóxido dismutasa (SOD) como se indica en la ecuación [2]. Aunque el H_2O_2 es altamente reactivo, al no ser un RL tiene una vida media más prolongada ⁸, lo que facilitaría su difusión al núcleo celular aumentando las probabilidades de realizar modificaciones genéticas, por sobre otros los RL que tienen una vida más corta ⁸. El H_2O_2 es eliminado gracias a enzimas como catalasa [3] o glutatión peroxidasa [4], pero también puede actuar como agente oxidante de Fe^{+2} de acuerdo con la reacción de Fenton [5] generando el radical hidroxilo ($\bullet OH$) que es altamente reactivo, atacando cualquier molécula oxidable cercana como los lípidos poliinsaturados de membrana, dando lugar a la peroxidación lipídica como se observa en las ecuaciones [6] y [7]^{5,7}.

Aunque el término estrés oxidativo no es completamente aceptado ⁹, en este trabajo de investigación se utilizará este término para describir los procesos involucrados en el daño no enzimático de macromoléculas que pueden contribuir al desarrollo de enfermedades asociadas.

1.2 Estrés oxidativo, y enfermedades asociadas

El aumento en las concentraciones prolongadas de ROS en el organismo se acompañan con diversas patologías.

Por ejemplo, en aterosclerosis, la oxidación de la Lipoproteína de baja densidad (LDL) es el primer paso para inducir la respuesta una respuesta inflamatoria, que conlleva un aumento de moléculas de adhesión, y citoquinas proinflamatoria, resultando en una agregación plaquetaria y la adhesión de los monocitos al endotelio ¹⁰.

En Diabetes mellitus y Cáncer, se observa un cambio a un estado prooxidativo del sistema redox de tior/disulfuros y una falla en el clearance de glucosa¹¹.

Otro de los procesos asociados al estrés oxidativo es el envejecimiento, el cual es un proceso natural que se caracteriza por un aumento en la

vulnerabilidad a enfermedades y la muerte ¹². En 1956, Denham Harman propuso la "Teoría del Envejecimiento Basada en Radicales Libres y Química Radical" ¹³ que sostiene que el aumento en la cantidad de radicales libres en el cuerpo puede causar daños y aumentar la predisposición a enfermedades. Aunque la teoría no tuvo inicialmente un amplio respaldo, el descubrimiento de la función de la enzima Superóxido Dismutasa (SOD) por McCord y Fridovich en 1969 proporcionó evidencia significativa. Se demostró que la enzima SOD actúa como un catalizador que convierte el radical libre (O_2^-) en peróxido de hidrógeno (H_2O_2) y oxígeno (O_2) ayudando a disminuir la cantidad de radicales libres en el cuerpo ¹⁴. Estos descubrimientos, junto con otros relacionados con enzimas antioxidantes, sentaron las bases para comprender este mecanismo.

La teoría del envejecimiento sostiene que el estrés oxidativo puede causar daños y aumentar la predisposición a enfermedades ^{5,8,14}. Entre las enfermedades fuertemente asociadas al envejecimiento se encuentran las enfermedades neurodegenerativas como el Alzheimer y el Parkinson, además del cáncer y la diabetes ^{4,15}. Estas enfermedades comparten un desequilibrio redox sostenido en el tiempo, lo que respalda la idea de

mantener el balance oxidativo adecuado puede ayudar a prevenir el desarrollo de enfermedades asociadas a la edad.

La homeostasis redox en el organismo es un proceso multifactorial, que depende de factores genéticos y ambientales (exposición a cigarro, polución, luz UV, etc.), donde el consumo de antioxidantes, y la ejercicio física regular ayudarían a mantener la homeostasis a nivel molecular, asegurando que se promueva un adecuada homeostasis redox en las células y tejidos del cuerpo (Pizzino et al., 2017, Ames et al., 1993; Sies, 2015).

Uno de los debates más interesantes que se han logrado llevar, es el real efecto del estilo de vida en la prevención de enfermedades asociadas al estrés oxidativo, es por eso, que en este trabajo abordaremos el efecto del ejercicio y la alimentación rica en compuestos fenólicos sobre el balance oxidativo y su efecto a nivel metabólico.

1.3 Ejercicio y estrés oxidativo

En 1978, Dillard y colaboradores llevaron a cabo uno de los primeros estudios relacionados con el efecto del ejercicio y la dieta sobre el estrés oxidativo. En este estudio, realizado en ratones y seres humanos, Dillard y colaboradores observaron cómo el ejercicio agudo aumentó la

peroxidación lipídica mediante la espiración de pentano, así como el efecto inhibitorio sobre la peroxidación lipídica ejercida por el consumo de vitamina E ¹⁶

Posteriormente, diversos estudios siguieron asociando el ejercicio físico y el aumento de los ROS generados durante el desarrollo de la actividad física con diversos estados patológicos, tales como el envejecimiento ¹⁷⁻¹⁹. Por ejemplo, Alessio evaluó los niveles de malonilaldehído (MDA) e hidroperóxidos lipídicos (LH) en el ejercicio físico de alta y mediana intensidad, observando aumentos significativos en los niveles de malonilaldehído en el músculo esquelético y una tendencia al aumento de hidroperóxidos lipídicos, sugiriendo que el ejercicio físico influye en la peroxidación lipídica y el estrés oxidativo muscular ^{19,20}, por lo cual podría tener un efecto sobre las patologías asociadas al estrés oxidativo ^{19,20}

Estudios posteriores como el de Sen y colaboradores en 1992 ²¹, refutan esta teoría al demostrar que el ejercicio físico regular tiene un impacto significativo en la adaptación favorable del ciclo de glutatión, tanto en perros y ratas, mejorando el estado detoxificante y antioxidante tanto en músculos como hígado ²¹.

Más adelante, el año 2008, una revisión de Power & Jackson, sugiere que el ejercicio físico regular, mantiene el equilibrio a través de diversas respuestas adaptativas moduladas por los ROS, como un aumento en la actividad de las SOD1 y SOD 2 entre un 20 y 112% ^{7,22}.

Por ejemplo, en la Figura 1.2 se muestra el efecto dual del peróxido de hidrógeno en el organismo. A bajas concentraciones, (1-10 nM) el H₂O₂ actúa como señalizador celular promoviendo una respuesta adaptativa al desbalance oxidativo a través del aumento de las cascadas de señalización mediada por Nrf-2. Por otro lado concentraciones mayores de H₂O₂, (0.1-10 μM) durante periodos prolongados generara daños moleculares a lípidos, proteínas y macromoléculas susceptibles, generando muerte celular ^{7,22}.

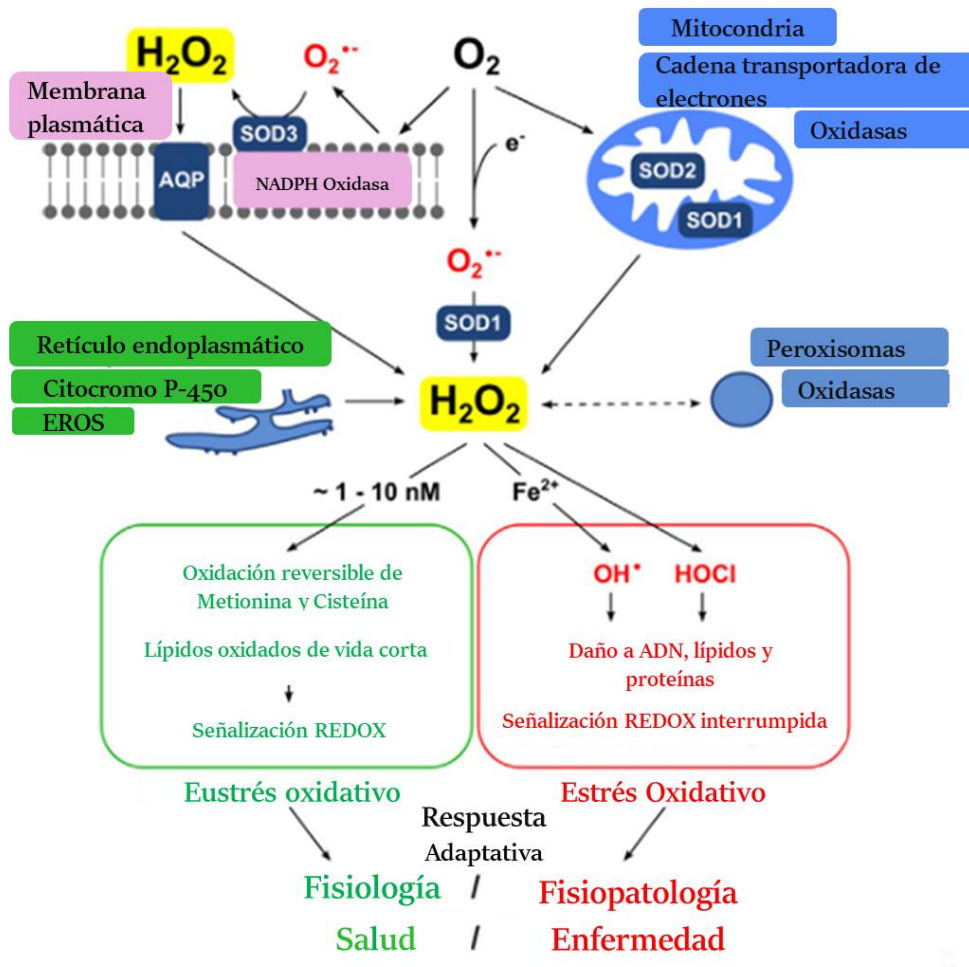


Figura 1.2 Dualidad de los efectos provocados por H_2O_2 en el metabolismo oxidativo: Las fuentes de H_2O_2 incluyen los complejos NADPH oxidasas unidas a la membrana, o libres provenientes de la mitocondria. La función de SODs. La difusión del H_2O_2 a través de acuaporinas (AQP) conocidas como peroxiporinas. En verde las cascadas de señalización mediante estrés oxidativo fisiológico y en rojo el daño

generado por un exceso de estrés oxidativo. Figura tomada y adaptada de Helmut Sies, 2017 ⁷

Con estos antecedentes, es interesante abordar si el ejercicio físico regular es capaz de modificar metabolitos asociados al estrés oxidativo derivados de la inactividad física y determinar una estrategia analítica que sea capaz de detectar dichos cambios.

1.4 Costos asociados a la inactividad física

La organización mundial de la salud estima que entre los años 2020 y 2030 se tendrán cerca de 500 millones de nuevos casos de enfermedades no transmisibles (ENT) ²³, lo que supone costos de tratamiento de algo más de 48000 millones de USD anuales, si no tiene lugar ningún cambio en la prevalencia actual de la inactividad física.

Casi la mitad de los nuevos casos de ENT (47%) serán consecuencia de la hipertensión, y el 43% de la depresión. Las tres cuartas partes de los casos corresponderán a países de ingresos bajos y medianos altos. El mayor costo económico se producirá en los países de ingresos altos, que representarán el 70% del gasto en atención de salud para el tratamiento de las enfermedades derivadas de la inactividad física ²³.

Una persona activa que realiza ejercicio regular tiene en promedio menos probabilidades de sufrir enfermedades propias de la edad, y la OMS recomienda realizar actividad física al menos 150 minutos de actividad de intensidad moderada (o equivalente) por semana, medida como una combinación de actividades físicas realizadas en múltiples ámbitos: en el trabajo (incluyendo el trabajo doméstico), durante los desplazamientos (caminar y andar en bicicleta) y para el tiempo de recreación (incluyendo deportes). Para los adolescentes, la recomendación de la OMS es de 60 minutos diarios de actividad de intensidad moderada a vigorosa ²⁴.

1.5 Alimentación, estrés oxidativo

Los “antioxidantes” químicamente son moléculas reductoras capaces de aceptar electrones, reduciendo su número de oxidación, o transfiriendo un hidrógeno. Estas moléculas reaccionan rápidamente ante la presencia de sustancias oxidantes, como el O₂. Las principales reacciones moleculares involucradas en el equilibrio redox del organismo, fueron descritas previamente. En lo que sigue del texto se acuñará el término Antioxidante debido a la popularidad y a su uso extendido en diversos estudios.

Como fue mencionado previamente, la alimentación desempeña un papel fundamental en la obtención de antioxidantes exógenos, los cuales son esenciales para contrarrestar el estrés oxidativo y sus efectos en el proceso de envejecimiento. Entre los antioxidantes más conocidos se encuentra la vitamina C (ácido ascórbico), una vitamina hidrosoluble presente en frutas, especialmente cítricas como naranjas, limones y kiwis²⁵. La vitamina C no solo ayuda a combatir el daño generado por los radicales libres, sino que también es capaz de regenerar la forma activa de la vitamina E, otro antioxidante importante²⁵. La vitamina E, conocida como α -tocoferol, pertenece al grupo de vitaminas liposolubles. Esta vitamina se encuentra en aceites vegetales y semillas, y desempeña un papel crucial en la protección de las membranas celulares contra el daño oxidativo²⁶.

El betacaroteno, un carotenoide presente en diversas frutas y verduras de tonalidades amarillas y naranjas, como zanahorias, calabazas y mangos, también es un precursor de la vitamina A y contribuye a la protección celular contra los efectos nocivos de los radicales libres²⁷.

Tabla 1.1 Principales antioxidantes y su fuente²⁸

Antioxidante	Alimentos Fuente
Vitamina C (Ácido Ascórbico)	Cítricos (naranjas, limones), fresas, kiwi
Vitamina E (Tocoferol)	Aceites vegetales, frutos secos, espinacas
Vitamina A (Beta-caroteno)	Zanahorias, espinacas, mango
Quercetina	Cebollas, manzanas, uvas, té, brócoli
Resveratrol	Uvas rojas, vino tinto, cacahuetes, arándanos
Curcumina	Cúrcuma (especia), curry, mostaza
Epigallocatequina (EGCG)	Té verde, té blanco
Antocianinas	Calafate, cerezas, uvas moradas, ciruelas, fresas
Ácido elágico	Granadas, fresas, frambuesas
Genisteína	Soja y productos de soja (tofu, tempeh)
Quercetina	Manzanas, cebollas, té, uvas, frutas cítricas
ácido clorogénico	Café

Además de las vitaminas, ciertos minerales esenciales también son parte fundamental de las enzimas antioxidantes presentes en el organismo. El manganeso (Mn), el zinc (Zn), el selenio (Se) y el cobre (Cu) son elementos esenciales que forman parte de enzimas antioxidantes como glutatión peroxidasa (Se) y superóxido dismutasa (Zn, Cu y Mn), desempeñando un papel crucial en la neutralización de especies reactivas del oxígeno, por cual su presencia en la alimentación resulta relevante de estudiar.

Por otra parte, los compuestos fenólicos (Compuestos que poseen al menos un grupo hidroxilo unido a un anillo aromático) son destacados antioxidantes presentes en una amplia variedad de alimentos de origen vegetal (Tabla 1.1). Estos compuestos se encuentran en frutas, verduras, té, vino tinto, entre otros, y han demostrado efectos beneficiosos para la salud debido a sus propiedades antioxidantes y su capacidad para contrarrestar el daño oxidativo.²⁹⁻³¹.

En Chile, se destaca la presencia del calafate, originario de la Patagonia chileno-argentina. Este fruto se revela como un objeto de estudio intrigante debido a su abundancia en compuestos fenólicos, especialmente antocianinas, y a la riqueza de ácidos hidroxicinámicos en sus hojas ³²⁻³⁴. Este interés nos lleva a adentrarnos en un análisis detallado su composición en el siguiente punto

1.6 Calafate, *Berberis microphylla* G. Forst

La familia Berberidiceae está distribuido ampliamente alrededor del mundo, especialmente en zonas subtropicales. En la Patagonia chileno-argentina existe una especie endémica perteneciente a esta familia, conocido coloquialmente como Calafate (*Berberis microphylla* G. Forst).

El Calafate es un arbusto con hojas perennes, raíz amarilla y que da una rica baya morada ³⁵. El calafate ha sido utilizado desde tiempos precolombinos principalmente por el pueblo Aónikenk o Patagones ³⁶. Ellos utilizaron la planta tanto como para su consumo en mermeladas, brebajes, medicamentos y tinturas, otorgándole propiedades curativas y mágicas a la planta ³⁷. El calafate, por lo tanto, es un símbolo de la Patagonia chilena-argentina, que últimamente ha ganado popularidad debido a su rico sabor, alto contenido de compuestos bioactivos y los potenciales efectos beneficiosos de sus compuestos sobre la salud.

El año 2010, en el departamento de Análisis Instrumental de la Universidad de Concepción, Ruiz y colaboradores determinó la concentración de flavonoides totales en frutos de maqui (*Aristotelia chilensis*), calafate y murtilla (*Ugni molinae*). Calafate y maqui presentaron altas concentraciones de antocianinas, 17.81 ± 0.98 y 17.88 ± 1.15 $\mu\text{mol/g}$ de peso fresco respectivamente, no encontrando diferencias significativas en el contenido de antocianinas entre estos frutos, las concentraciones de antocianinas en murtilla fueron muy bajas en comparación al maqui y calafate (0.21 ± 1.08 $\mu\text{mol/g}$ de peso fresco). En cuanto al contenido de flavonoles y flavan-3-oles, las concentraciones para calafate, maqui y murtilla fueron: 0.16 ± 0.01 y

0.24 ± 0.03 ; 0.12 ± 0.01 y 0.11 ± 0.01 y 0.29 ± 0.01 y 0.27 ± 0.03 $\mu\text{mol/g}$ de peso fresco. Encontrando que los compuestos fenólicos principales en maqui y calafate fueron las antocianinas y que en murtillos los flavonoles. En nuevos estudios del grupo de investigación, el año 2013 Ruiz y colaboradores, realizaron una caracterización de los antocianos presentes en otros frutos silvestres chilenos como el arándano chileno, mutilla y calafate. El arándano presento el perfil más complejo de antocianos, pero el calafate presentó la mayor capacidad antioxidante y el mayor contenido de antocianinas (28.82 ± 5.10 $\mu\text{mol/g}$ de peso fresco), lo cual lo sitúa como un excelente alimento funcional para promover la salud ³⁸.

Otro estudio en el fruto del calafate por Ruiz y colaboradores el año 2014, identificó la presencia de los alcaloides en la planta con el objetivo de determinar su inocuidad alimentaria. En este estudio se identificó la presencia de tres alcaloides: berberina; jatrorrizina y palmatina. La cuantificación en el fruto de calafate de berberina dio concentraciones de inocuidad alimentaria para este alcaloide (32.7 ± 11.9 nmol/g de peso fresco) tanto en el fruto como en la hoja, pero presentó altas concentraciones en la raíz 4655.7 ± 1067.3 nmol/g de peso fresco) ³⁹. A bajas concentraciones los alcaloides presentan propiedades

antimicrobianas, antiinflamatorios, antioxidantes, hipoglicemiantes e hipolipidémicos ⁴⁰⁻⁴². La Berberina tiene un color amarillo por lo que la raíz se ha usado para fines medicinales y para tinción de lana ⁴³. Se ha encontrado berberina en el fruto en concentraciones que varían dependiendo del estado de madurez del fruto, entre 47.0 y 41.9 nmol por g ramo de peso fresco en la baya verde y la baya madura, lo que sería consistente con la protección química que la planta le otorga al fruto es sus procesos de maduración ³⁹.

Las propiedades de los compuestos encontrados en el calafate hacen de esta planta un candidato relevante para evaluar su efecto sobre el metabolismo en un modelo in vivo. Dada su abundancia en compuestos fenólicos, es esencial examinar las características y el metabolismo de estos compuestos como paso previo. Este análisis es crucial para comprender cómo el consumo de esta planta podría afectar el metabolismo del hospedador

1.7 Compuestos fenólicos

Los compuestos fenólicos son una clase de metabolitos secundarios ampliamente distribuidos en el reino vegetal. Estos compuestos se

caracterizan por contener al menos un grupo fenol en su estructura química, aunque resulta común encontrarlo como compuestos fenólicos.

Los compuestos fenólicos se pueden clasificar en tres grandes grupos en tres grandes grupos (Figura 1.3): Ácidos fenólicos (ácidos hidroxibenzoicos e hidroxicinámicos); Flavonoides (flavonas, flavonoles, flavan-3-oles, isoflavonas, flavanonas y antocianidinas o antocianinas); y otros compuestos fenólicos (estilbenos, lignanos, taninos, xantonas, ligninas, cromonas y antraquinonas) ⁴⁴.

En las plantas los compuestos fenólicos desarrollan diversas funciones, actúan como elementos de defensa frente a herbívoros y patógenos, contribuyen a la regulación del crecimiento y desarrollo de las plantas, participando en la modulación de diferentes procesos fisiológicos. También intervienen en la respuesta de las plantas a condiciones ambientales adversas, como el estrés abiótico y biótico al actuar como antioxidantes y reducir el daño oxidativo ^{45,46}.

Además de las funciones de defensa y regulación, los compuestos fenólicos influyen en la calidad de los productos vegetales, afectando sus propiedades organolépticas y su resistencia a la degradación ⁴⁷. También participan en la comunicación entre las plantas y otros organismos del

ecosistema, como los polinizadores, a través de sus aromas y sabores característicos ^{48,49}

Se estima que existen al menos 8000 compuestos fenólicos que han sido aislados y descritos hasta la fecha, y se siguen descubriendo nuevos compuestos y rutas metabólicas en diversas especies vegetales ⁴⁵.

Esta diversidad de compuestos fenólicos se debe a la variedad de estructuras que derivan de las diferentes rutas biosintéticas, cómo la vía del ácido shikímico o malonato ^{50,51}.

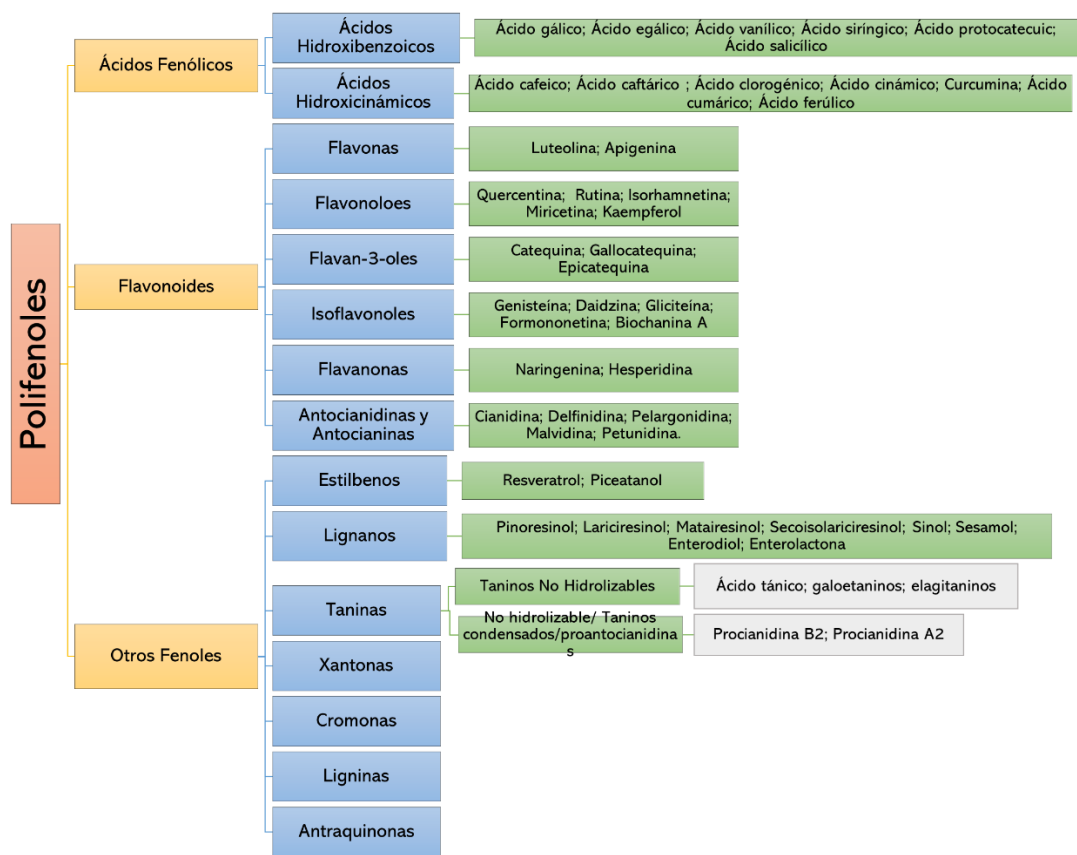


Figura 1.3 Clasificación de compuestos fenólicos. Adaptado de Martínez, 2017 ⁴⁴

La biosíntesis a través de la vía fenilpropanoide produce una variedad de compuestos fenólicos como: ácidos cinámicos (C6-C3); ácidos benzoicos (C6-C1); flavonoides (C6-C3-C6); proantocianidinas [(C6-C3-C6)_n], cumarinas (C6-C3); estilbenos (C6-C2-C6); lignanos (C6-C3-C3-C6) ⁵².

El contenido de compuestos fenólicos en las plantas varía entre 1 y 3 mg/kg y está influenciado por diversos factores, como estado de

madurez, parte de la planta, condiciones de cultivo, procesamiento, almacenamiento, entre otros ⁵³.

En nuestro estudio nos resulta interesante abordar ácidos hidroxicinámicos y antocianos que son los compuestos fenólicos más abundante presentes en frutos y hojas de calafate

1.7.1 **Ácidos hidroxicinámicos**

Los ácidos hidroxicinámicos (HCAs) pertenecen a los ácidos fenólicos (Figura 1.3), La estructura básica de los HCAs incluye un anillo fenólico con un grupo hidroxilo en posición orto al anillo carboxílico (Figura 1.4) ⁵⁴⁻⁵⁶. Su biosíntesis comienza con la fenilalanina y luego ingresa a la vía del ácido shíkimico, que lleva a la síntesis de aminoácidos aromáticos como la fenilalanina y tirosina. Los ácidos hidroxicinámicos (HCAs) se forman mediante la desaminación de la fenilalanina o la tirosina para producir la unidad C₆C₃ que sirve como estructura central de los fenilpropanoides; la desaminación está catalizada por la enzima fenilalanina amonio-liasa (PAL)⁵⁷.

Por ejemplo, el ácido clorogénico es un tipo específico de ácido hidroxicinámico que se encuentra comúnmente en alimentos como

granos de café, hojas de calafate, entre otros. ^{58,59}. Su estructura incluye un anillo de ácido cinámico unido a una molécula de ácido quínico

En general, frutas y vegetales contienen muchos ácidos fenólicos libres, mientras en granos y semillas a menudo se encuentran unidos al material estructural ^{31,57}.

1.7.2 **Antocianinas**

Las antocianinas son una clase diversa de flavonoides que están compuestas por un esqueleto de antocianidina con conjugados de azúcar y acilo. Los antocianidinas están formadas por dos anillos aromáticos de benceno separados por un heterociclo oxigenado ⁶⁰. Los derivados de la delfinidina son las únicas antocianinas identificadas en violeta, en frutos de calafate la delfinidina-3-glucósido es el componente principal ³⁸. Su biosíntesis se detalla en la Figura 1.5, donde se observan las enzimas involucradas.

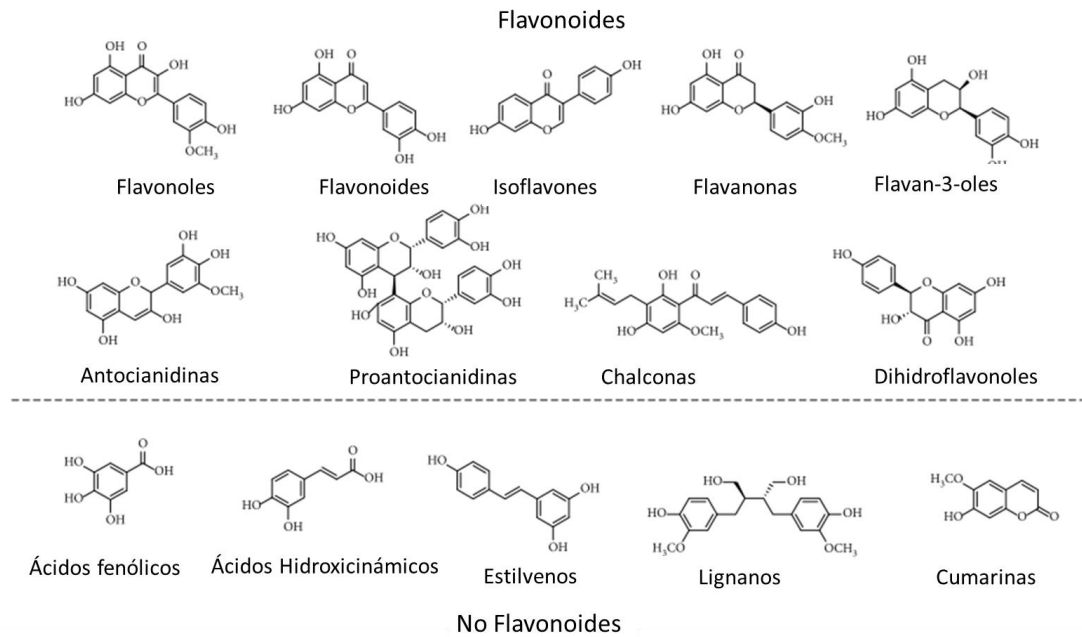


Figura 1.4 Estructura de los principales compuestos fenólicos encontrados en la naturaleza. Adaptada de Liu et al.,2019 ⁵⁶.

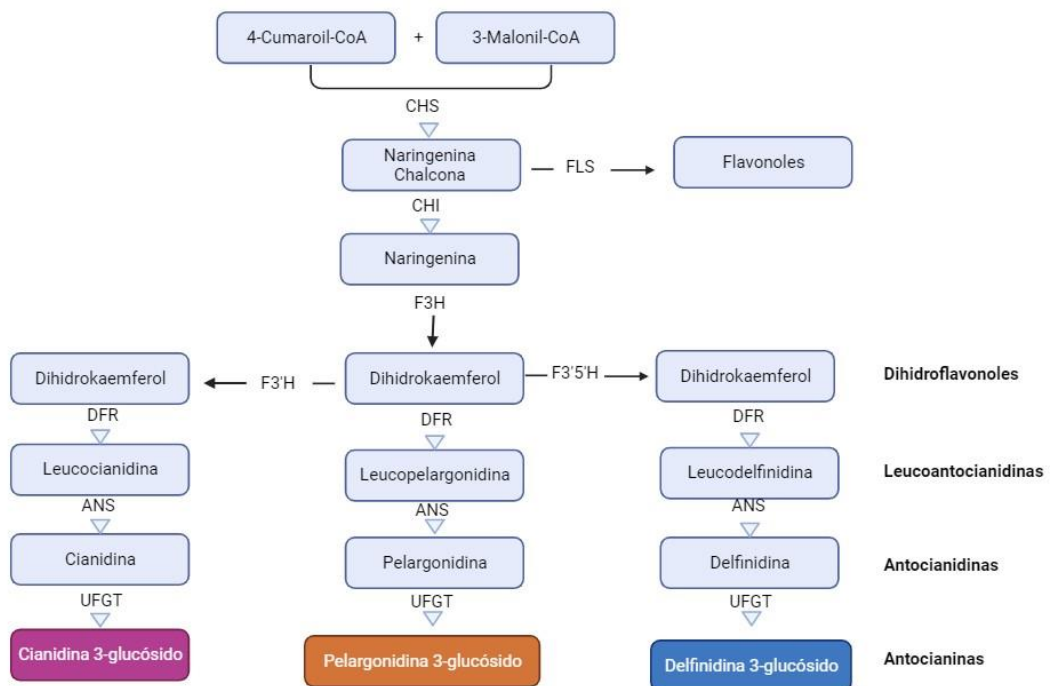


Figura 1.5 Esquema que representa la vía de biosíntesis de las antocianinas y las diferentes enzimas involucradas: CHS: chalcona sintasa; CHI: chalcona isomerasa; F3H: flavanona 3-hidroxilasa; F3'H: flavonoide 3'-hidroxilasa; F3'5'H: flavonoide 3',5'-hidroxilasa; DFR: dihidroflavonol4-reductasa; ANS: antocianidina sintasa; UFGT: flavonoide 3-O-glucosiltransferasa y FLS: flavonol sintasa. Diagrama tomado y adaptado de Liu et al., 2018 ⁶⁰

Además de examinar la estructura y síntesis de los compuestos fenólicos, resulta necesario abordar su metabolismo para comprender la manera en que estos compuestos generan efectos en el organismo. Este aspecto específico será desarrollado con mayor detalle en la siguiente sección,

proporcionando una perspectiva más profunda sobre los procesos bioquímicos que subyacen a los impactos de los compuestos fenólicos en la salud

1.8 Metabolización de los compuestos fenólicos

1.8.1 Compuestos fenólicos y estrés oxidativo

Los compuestos fenólicos modulan el estrés oxidativo a través de diversos mecanismos metabólicos. Por ejemplo, los ácidos fenólicos actúan como queladores y atrapadores de radicales libres, especialmente sobre radicales hidroxilos, peroxilos, aniones superóxidos y peroxinitrilos, mediante el mecanismo molecular vía transferencia de protones (HAT, por sus siglas en inglés) ⁶¹.

Las cantidades necesarias de antioxidantes exógenos para el consumo varían en función de factores como la edad, el nivel de actividad física, el estado nutricional y las características fisiológicas de los individuos. Una de las principales fuentes de obtención de antioxidantes es a través de bebidas ricas en estos compuestos ⁶². Por ejemplo, el café contiene entre 200-550 mg de antioxidantes totales (TAC, por sus siglas en inglés) por taza, principalmente debido a la presencia de ácidos clorogénicos, ferúlicos o cumáricos. El té proporciona entre 150-400 mg

de TAC por taza, relacionados con la presencia de catequinas en la infusión. El vino, por su parte, contiene entre 150-400 mg de TAC por copa, siendo el resveratrol y los estilbenos los antioxidantes principales en este caso ⁶².

1.8.2 **Biodisponibilidad de los compuestos fenólicos**

Los compuestos fenólicos presentes en diversos alimentos al ser consumidos a través de la dieta ingresan al organismo y se someten a un proceso de metabolización. En el contexto del metabolismo de los compuestos fenólicos, se utilizan varios términos clave. La "bioaccesibilidad" se refiere a la proporción de un compuesto consumido que se libera de una matriz alimentaria durante la digestión, permitiendo su paso a través de las membranas durante el tránsito por el estómago y llegando al intestino delgado, donde puede ser absorbido o biotransformado por la microbiota intestinal ⁶³. La "bioactividad" representa la actividad de los compuestos absorbidos o sus metabolitos en las vías metabólicas, lo que resulta en efectos biológicos en el cuerpo. Además, se considera la "biodisponibilidad" para evaluar el grado en que un compuesto fenólico se mantiene intacto o protegido durante su transporte a través del tracto gastrointestinal. Por último, la

"biodisponibilidad" se refiere a la cantidad de compuestos que completan la ruta a través del tracto digestivo, son absorbidos y alcanzan los tejidos diana en forma intacta o metabolizada para ejercer su bioactividad o ser almacenados. Estos términos son fundamentales para entender el destino y los efectos biológicos de los compuestos fenólicos en el organismo humano ^{44,64,65}.

La absorción de los compuestos fenólicos está influenciada por su estructura, grado de polimerización, tipos de interacciones su matriz, estado dietético, composición de la dieta, pH intestinal y abundancia de enzimas digestivas ⁶⁴. Por ejemplo, como se muestra en la Figura 1.6, la difusión de compuestos fenólicos conjugados a través de los enterocitos no es posible, por lo que requiere un proceso de deconjugación mediante la acción de las enzimas β -glucosidasas presentes en las vellosidades del intestino delgado, para pasar a través de los enterocitos ⁴⁴. Posteriormente, la aglicona correspondientes se someten a metabolismo de Fase I (reducción, oxidación o hidrólisis) o Fase II (por ejemplo, conjugación) en el enterocito, convirtiéndola en un éster metílico, un glucurónido o sulfato, o bien se transporta como una aglicona al hígado para un metabolismo similar ⁴⁴.

La conjugación de agliconas reduce su potencial toxicidad microbiana y facilita su transporte como compuestos fenólicos biotransformados. Además, los macronutrientes dietéticos pueden alterar la composición de las bacterias intestinales, lo que a su vez influye en la biotransformación de compuestos fenólicos en el tracto gastrointestinal ⁶⁶, por ejemplo, una comida alta en grasas aumenta selectivamente la bioaccesibilidad de algunas antocianinas, como la delfinidina-3-glucosido, delfinidina-3-galactósido o petunidina-3-arabinósido, pero se observó que en condiciones de ayuno la bioaccesibilidad de delfinidina-3-(6"-acetoil)-glucósido y malvidina-3-arabinósido aumentó al doble ayuno ⁶⁷. Matrices ricas en proteínas protegen las antocianinas de la degradación en el intestino delgado, lo que las hace disponibles para la biotransformación microbiana en el colon ⁶⁷. Luego de la absorción son transportadas a los diferentes tejidos a través del torrente sanguíneo, donde pueden presentar otras biotransformaciones en compuestos más solubles para su eliminación ⁶⁸.

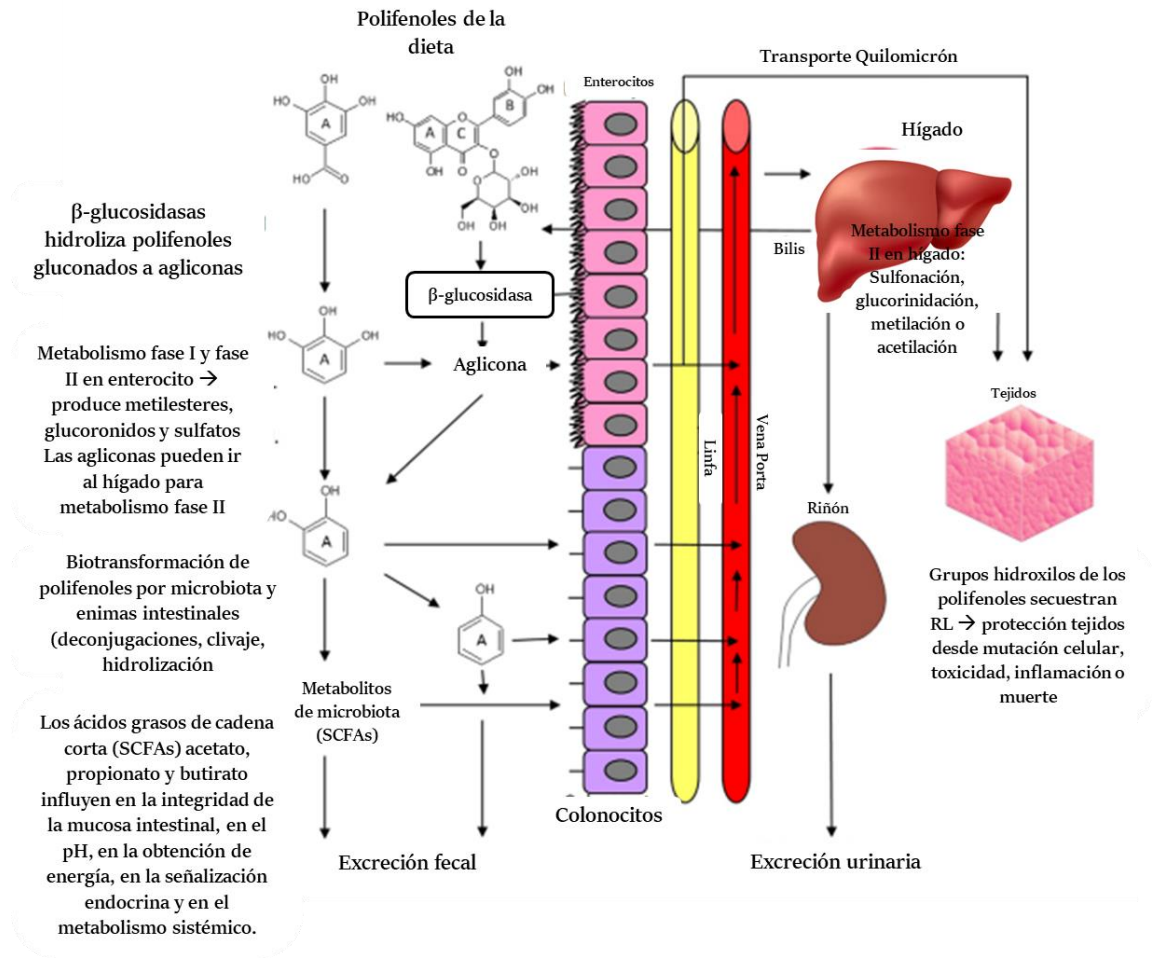


Figura 1.6 Metabolismo y destino de los compuestos fenólicos en la dieta. En la figura se detalla la absorción de los compuestos fenólicos, los procesos de conjugación mediante B-glucosidasas, su absorción y su transporte. Imagen tomada y adaptada de Martinez ⁴⁴

Las concentraciones máximas en el plasma normalmente se encuentran luego de 1 hora de ingerido en alimento. La concentración máxima en

los estudios farmacocinéticos de un compuesto en cualquier momento del estudio suele ser menor a 2.5 h, que va a depender de que tan lleno se encuentre el estómago del individuo ⁶⁹. Los compuestos que suelen aparecer en una concentración máxima luego de 3 h de consumido o luego de 5 horas en un estudio farmacocinético, se consideran que son absorbidos principalmente por el colón, lo que genera sin excepción una metabolización por parte de la microbiota intestinal ⁷⁰.

Algunos compuestos fenólicos se pueden absorber forma intacta ⁷¹ o sufrir pequeñas modificaciones como conjugaciones con ácidos glucorónicos o sulfatos. Por ejemplo, algunos flavonoles como quercetina o quercetina glicosídica, después de una ingesta oral, tanto la quercetina y sus metabolitos metilados, como la isorhamnetina y la tamarixetina, aparecen en la circulación de ratas y humanos casi exclusivamente en su forma conjugada ⁷².

Una revisión de Manach 2005 y Prior 2006 ^{73,74}, en antocianinas que son los compuestos fenólicos mayoritarios en el fruto de calafate, indicó el tiempo promedio para alcanzar la concentración máxima (C_{max}) en plasma fue de 1.5 horas (rango: 0.75-4 horas), mientras que en la orina fue de 2.5 horas. La excreción urinaria parece ser relativa baja oscilando entre 0.004% y el 0.1% de la ingesta. El curso temporal de absorción fue

consistente con la absorción en el estómago, como se describe en los animales. En la revisión Manach indica que aparentemente las antocianinas se absorben y eliminan muy rápidamente, presentando una absorción de baja eficiencia, aunque indica que los métodos para su detección pueden no ser efectivos, ya que usan métodos con detección UV, suponiendo la conversión a catión flavilio de color violeta a pH bajo, pero pueden existir formas neutras por interacciones con otros componentes del plasma u orina que no permitan su detección ⁷³.

En nuestro grupo de investigación, el año 2018 Bustamante y colaboradores ⁷⁵ se desarrolló un estudio farmacocinético luego de consumo agudo de 300 mg/kg de un extracto de fruto de calafate, y se determinaron los metabolitos a las 4 y 8 horas posterior al consumo del extracto. La caracterización previa de los principales compuestos fenólicos presentes en el extracto mostró que alrededor del 85% correspondía a antocianinas, alrededor de un 10% a ácidos hidroxicinámicos (HCA, por sus siglas en inglés) y alrededor de un 5% a flavonoles. Los resultados del estudio arrojaron que a pesar de que las antocianinas son la principal fuente de compuestos fenólicos presentes en el extracto, la presencia en el plasma de jerbos a las 4 y 8 horas no fue detectada, lo cual se corresponde con la revisión realizada por Manach

anteriormente donde indica que las mayores concentraciones de antocianinas fueron encontradas a las 1.5 hora, estimando una baja absorción y rápida eliminación (Manach et al., 2005). Bustamante y colaboradores identificaron una elevada concentración plasmática de compuestos fenólicos, con una predominancia significativa de derivados de ácidos benzoicos y ácidos hidroxicinámicos en el estudio. Estos resultados sugieren la posibilidad de una mayor absorción de estos compuestos fenólicos en conjunto con una metabolización rápida de las antocianinas a través de biotransformaciones en el organismo, lo que conduce a la formación de ácidos benzoicos e hidroxicinámicos y, en consecuencia, a una mayor detección de estos compuestos en el organismo.

Estudios posteriores realizados en un modelo de ratones alimentados con una dieta alta en grasas (HFD, por sus siglas en inglés) con consumo crónico de un extracto de calafate, mostró diferencias en metabolitos asociados a estrés oxidativo y enfermedad cardiovascular. HFD que consumieron calafate presentaron menores niveles de los marcadores endoteliales sE -selectina, sICAM, proMM-9, asociadas a enfermedad cardiovascular ⁷⁶

En conclusión, la investigación de los efectos de los compuestos fenólicos en un alimento exige un análisis minucioso del alimento seleccionado para evaluar su impacto en el metabolismo del hospedador. Asimismo, es esencial abordar la necesidad de mantener concentraciones estables en estudios a largo plazo, dada la rápida metabolización de los compuestos fenólicos.

Por otro lado, los efectos asociados al ejercicio físico también deben poder detectarse, es por eso que la elección de la técnica analítica para determinar estos cambios debe ser apropiada y sensible para asegurar su detección precisa

1.9 Técnicas analíticas modernas para el análisis de compuestos fenólicos en un modelo animal.

Resulta interesante estudiar a través de una estrategia analítica sensible, el efecto en el metabolismo de una dieta rica en polifenoles y del ejercicio aeróbico regular. Una de las estrategias analíticas más utilizadas para el estudio de metabolitos es la Metabolómica, la cual involucra el estudio de los metabolitos presentes en un organismo en un momento determinado, lo que describe el fenotipo de un individuo en el momento en que se toma la muestra.^{77,78}

La metabolómica es una rama de la “ciencia ómica” que involucra el estudio y la caracterización integral del metabolismo y todos los metabolitos presentes en sistemas biológicos en un momento determinado ⁷⁹. La metabolómica utiliza un enfoque integrado con poderosos algoritmos matemáticos con los cuales es posible generar una “huella dactilar” de procesos celulares específicos ⁸⁰⁻⁸². Es habitual conceptualizar la disciplina de la "Metabolómica" bajo la denominación de "Metabolómica no dirigida" o en inglés "Untargeted metabolomics", debido a la innata ausencia de un objetivo predefinido en el enfoque metabolómico. Cabe resaltar que el término "Metabolómica dirigida" o "Targeted metabolomics" merece ser reemplazado por el concepto de análisis bioquímico de un analito o conjunto de analitos. Este ajuste terminológico preserva la integridad del concepto de "metabolómica" para describir el estudio comprehensivo de la totalidad de metabolitos posibles dentro de una muestra. Dicho abordaje global provee una panorámica más enriquecedora del estado fisiopatológico del sistema en contraposición al estudio enfocado en uno o varios analitos específicos.

Los metabolitos, constituyen moléculas de baja masa molecular que emergen como intermediarios o productos finales de múltiples rutas bioquímicas ⁸². En el ámbito de las disciplinas "ómicas", los metabolitos

pueden representar los productos resultantes de la transcripción y la subsiguiente traducción génica (proteínas). En comparación a la genómica y proteómica, la metabolómica otorga una imagen clara del fenotipo de un sistema biológico en el momento del muestreo ⁸³.

Uno de los principales objetivos de la Metabolómica es identificar nuevos biomarcadores. Estos biomarcadores tienen el potencial de desempeñar un papel fundamental en diversas áreas, que incluyen el diagnóstico en etapas tempranas, la categorización de enfermedades, el seguimiento de la evolución y la evaluación de la respuesta a tratamientos médicos, entre otras aplicaciones ⁸¹. Es importante destacar que estos nuevos biomarcadores podrían también influir en la modificación de fármacos ya desarrollados, además de respaldar la realización de estudios de "prueba de concepto" en las fases I y II de ensayos clínicos para nuevos tratamientos ⁸¹.

La selección de los métodos analíticos empleados en los experimentos de Metabolómica se encuentra primordialmente restringida por su capacidad para revelar las diferencias metabólicas derivadas de las perturbaciones del sistema en estudio. Entre las características anheladas se cuentan la necesidad de mínima preparación de las muestras y la habilidad de llevar a cabo análisis con elevado rendimiento ⁸⁴. En el

ámbito de la Metabolómica, las técnicas analíticas más utilizadas comprenden la Resonancia Magnética Nuclear (RMN) y la Espectrometría de Masas de alta resolución (HRMS) ⁸². En general, la espectrometría de masas es precedida por procesos de separación cromatográfica, utilizadas para reducir la complejidad de las muestras y permitir el análisis de distintos conjuntos de moléculas en momentos específicos. En este contexto, las técnicas de cromatografía líquida (LC) y cromatografía de gases (GC) acopladas a detectores de MS de alta resolución son las modalidades de acoplamiento más utilizadas ⁸⁵.

El uso de técnicas como acopladas para el descubrimiento de nuevos biomarcadores con relevancia para el diagnóstico de patologías u otros procesos metabólicos de interés consiste en una etapa de "descubrimiento". Esta fase involucra la manipulación de un conjunto limitado de muestras, generando una metadata que posteriormente es sometida a análisis mediante algoritmos quimiométricos, como el Análisis de Componentes Principales (PCA). El siguiente paso radica en la validación del método. Esta validación abarca la medición de blancos, con el fin de evaluar su potencial como biomarcadores. Además, se requiere de un conjunto más amplio de muestras para evaluar la

capacidad diagnóstica de biomarcadores, contemplando aspectos como sensibilidad, robustez y especificidad del estudio ⁸⁶.

El análisis metabolómico a implica una secuencia de 6 pasos: 1) Generación y recolección de las muestras; 2) preparación de la muestra; 3) Análisis de muestra; 4) Adquisición de los datos; 5) Procesamiento bioinformático; e 6) Identificación de marcadores ⁸⁷.

La obtención precisa de las muestras se revela como un componente crítico en la ejecución de análisis metabolómicos, desempeñando el papel de ventana que captura los eventos bioquímicos en un sistema biológico en un instante específico (momento pre-muestreo). En este contexto, resulta imperativo abordar múltiples consideraciones: a) el tipo de experimento a realizar, distinguiendo entre un enfoque metabolómico puro y un análisis "dirigido"; b) la naturaleza de la muestra a evaluar, contemplando opciones entre fluidos biológicos y tejidos; c) la complejidad intrínseca del sistema bajo estudio; y d) la variabilidad inherente entre los sujetos analizados. Cada una de estas facetas juega un papel crucial en la fidelidad y relevancia de los resultados metabolómicos en el contexto de la investigación ⁸⁷.

Dadas las ventajas intrínsecas de la cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas de alta resolución (LC-MS), esta técnica se sitúa como una de las herramientas más utilizadas en el campo de la Metabolómica ⁸⁸. Entre sus características distintivas destacan: su elevada precisión analítica, capacidad de resolución ampliamente superior, una sensibilidad y especificidad sobresalientes. Además, su exigua necesidad de preparación de las muestras (usualmente prescindiendo de derivatización) la faculta para lidiar con mezclas complejas que incorporan compuestos tanto polares como apolares ⁸⁸.

No obstante, conviene resaltar ciertas limitaciones asociadas con esta técnica en el contexto de la Metabolómica. Su acoplamiento a un detector de espectrometría de masas en tándem (MS-MS o MSⁿ) es crucial, aunque este vínculo puede inducir efectos de matriz que conllevan supresión iónica y generación de aductos. Estos fenómenos pueden enmascarar la interpretación estructural precisa de los analitos, presentando así un desafío para la dilucidación de las estructuras moleculares ⁸³.

En el año 2006, el Grupo de Trabajo para Análisis Químico (CAWG, por sus siglas en inglés) elaboró un conjunto de Iniciativas de Estándares Mínimos para Metabolómica (MSI, por sus siglas en inglés). Esta guía

abarca múltiples aspectos, que van desde la preparación de la muestra y el diseño experimental hasta el funcionamiento instrumental, la validación metodológica, la identificación de metabolitos y el preprocesamiento de los datos ⁸⁹.

Para obtener datos de alta calidad en los estudios Metabolómicos mediante LC-MS, es esencial considerar diversos factores. Entre estos factores se encuentran: el número de réplicas experimentales, los procedimientos de procesamiento de muestras (que abarcan desde la liofilización hasta la homogeneización), los métodos de extracción y almacenamiento (incluyendo el solvente, pH, buffer, temperatura, tiempo, volumen y peso, además de la desgasificación), los niveles de concentración (mediante diluciones, enriquecimiento, limpieza y solubilización), las condiciones de inyección cromatográfica, las columnas y precolumnas empleadas, los métodos de separación, la fuente y el modo de ionización (ya sea positiva o negativa), así como los modos de adquisición y los parámetros de adquisición de datos (como el rango de escaneo, la calibración, la exactitud y la resolución) ⁹⁰.

Una vez se obtiene la data generada, el proceso inicial implica la conversión de todos los archivos generados por el equipo a un formato tabulado y organizado. Esta preparación habilita el siguiente análisis a

través de estudios estadísticos y quimiométricos. De acuerdo con las directrices de las Iniciativas de Estándares Mínimos para Metabolómica (MSI), se deben seguir los siguientes pasos ⁸⁹: 1) Informar sobre el formato de archivo de datos empleado y/o los métodos de conversión utilizados. Entre los formatos comunes se incluyen XML, MZmine, net.cdf, entre otros; 2) Detallar cualquier proceso de preprocesamiento de datos implementado, indicando los pasos específicos que transforman los datos experimentales en bruto en un formato organizado y tabulado.

La cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas (LC-MS), el preprocesamiento de datos abarca distintas etapas, que incluyen: 1) Sustracción del fondo; 2) Reducción del ruido; 3) Alineamiento de datos; 4) Identificación de picos (peak picking en inglés), donde se requiere localizar con precisión, calcular la altura, determinar la cuenta total de iones y establecer el ancho máximo a mitad de altura (FWHM) de todos los picos en el espectro de masas; 5) Definición de la intensidad mínima del pico, que establece el umbral mínimo para considerar un pico como válido; 6) Deconvolución espectral; 7) Identificación de metabolitos ⁹¹.

Los detalles experimentales que describen estos métodos generales deben ser debidamente consignados, proporcionando información suficiente para que otros investigadores puedan reproducir el proceso de

procesamiento de datos de manera precisa ⁹¹, por lo tanto la metabolómica es una buena alternativa para evaluar las diferencias de los metabolitos de un grupo de estudios.

Mediante las metodologías analíticas descritas, se desea evaluar el efecto del ejercicio físico regular y el consumo crónico de extractos de calafate, con el objetivo de identificar biomarcadores asociados a estrés oxidativo.

Capítulo 2 Hipotesis y Objetivos

2.1 Hipótesis

El ejercicio y extractos de calafate ricos en compuestos fenólicos modifican marcadores metabólicos de toxicidad disminuyendo el estrés oxidativo y por tanto tienen un efecto positivo sobre enfermedades asociadas a envejecimiento.

2.2 Objetivo principal

Identificar y estudiar metabolitos diferenciadores, asociados al estrés oxidativo, en un modelo de ratones envejecidos sometidos a ejercicios y a una dieta rica en compuestos fenólicos.

2.3 Objetivos específicos

2.3.1 Caracterizar el potencial bioactivo del calafate (hoja y fruto) para su potencial uso en modelo desarrollado de intervención de animales in vivo

2.3.2 Diseñar y desarrollar un modelo de intervención de animales in vivo, basado en una pauta de ejercicio y consumo de compuestos fenólicos, para evaluar cambios sobre el perfil metabólico en plasma de los animales.

2.3.3 Realizar intervención nutricional y de ejercicio aeróbico usando modelo desarrollado de intervención de animales in vivo

Capítulo 3 Estrategia Analítica

3.1 Caracterización de hojas de Berberis

Con el objetivo de identificar el contenido de moléculas bioactivas en hojas de distintas especies de Berberis, se llevó a cabo una caracterización de compuestos polares y semipolares siguiendo el protocolo establecido por Ruiz et al.⁹² para ácidos hidroxicinámicos y flavonoles, con algunas modificaciones lograr una caracterización completa mediante HPLC-DAD-MS/MS.⁹² Además, se identificaron y cuantificaron los ácidos grasos mediante GC-MS, la presencia de alcaloides mediante HPLC-FL, el contenido fenólico total mediante el método de Folin-Cicalteau y su capacidad antioxidante in vitro mediante los ensayos CUPRAC, ORAC, ABTS.⁹³⁻¹⁰¹ de acuerdo al esquema presentado en la Figura 3.1

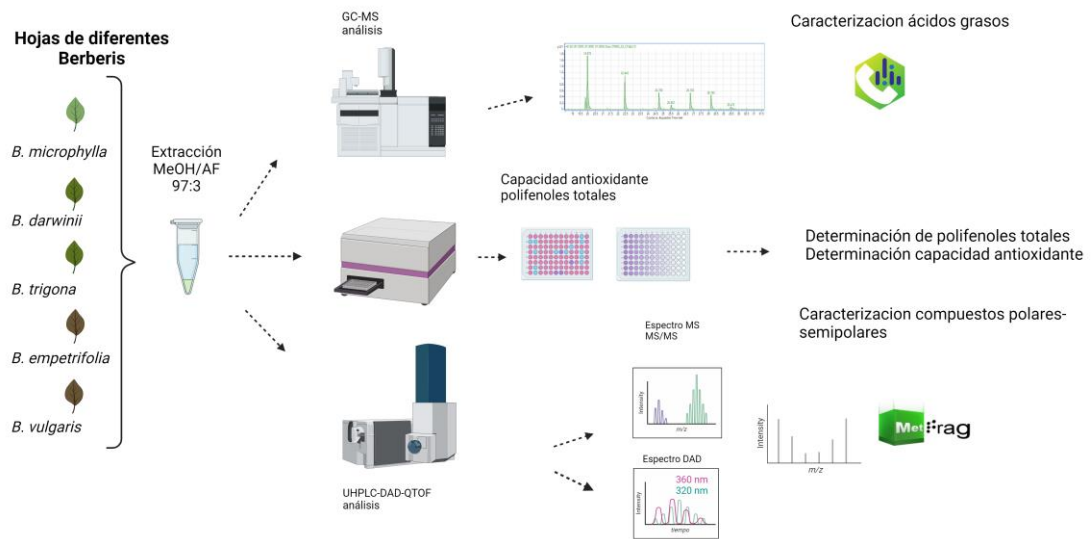


Figura 3.1 Estrategia analítica para la caracterización de hojas de *Berberis* sp

3.2 Análisis de una infusión de calafate

Luego de evaluar la concentración y el efecto antioxidante de los distintos extractos metanólicos de las hojas de *Berberis*, y obtener como resultado que la hoja de *Berberis microphylla* presenta el mayor contenido de moléculas bioactivas, se planteó evaluar el potencial de una infusión de hojas de *Berberis microphylla* como alimento funcional.

Se realizó una infusión de calafate con las mismas proporciones comerciales utilizadas en una infusión de té (0.25 g en 25 mL de H₂O recién hervida). La evaluación de la infusión de calafate (CI por sus

siglas en inglés) involucró la caracterización mediante espectrometría de alta resolución (HPLC-QTOF) y su comparación con el extracto metanólico. Se estudió la presencia de metales en la infusión mediante tecnología de Fluorescencia de Rayos X por Reflexión Total (TXRF, por sus siglas en inglés) la presencia de metales en la infusión. Posteriormente, se llevaron a cabo ensayos *in vitro* para evaluar su potencial antioxidante, así como ensayos en modelos celulares para evaluar su toxicidad. Finalmente, se investigó el efecto de la infusión en enzimas digestivas, obteniendo una completa visión de la infusión para estudios posteriores.

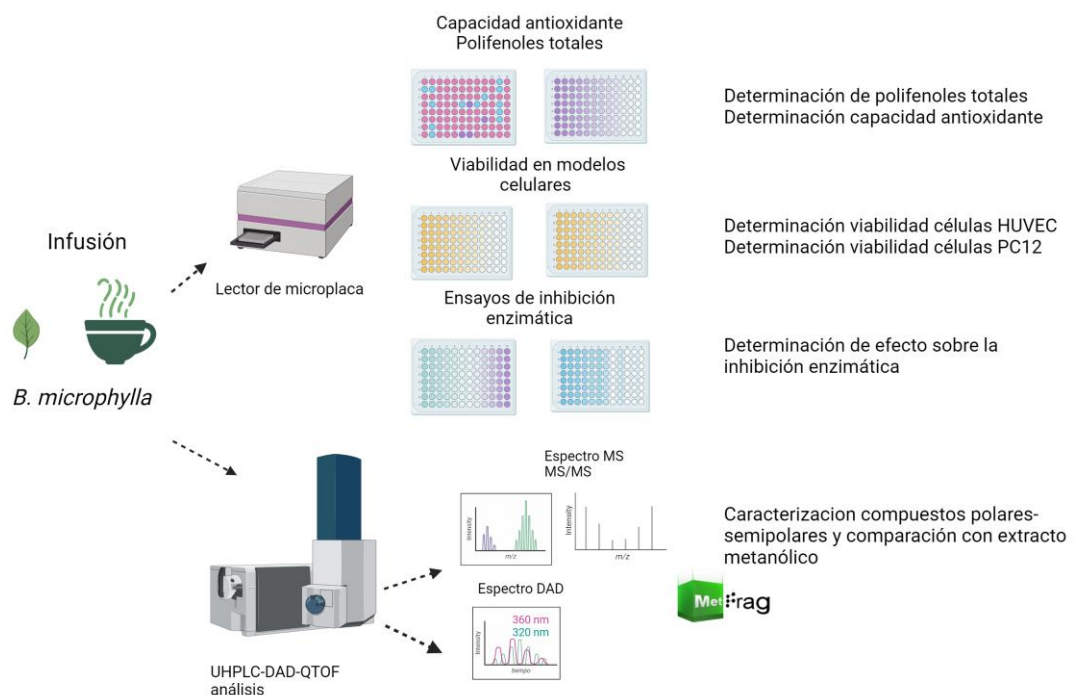


Figura 3.2 Estrategia analítica para el análisis de la infusión de calafate

3.3 Obtención de un Modelo de estudio para evaluar el efecto de un extracto rico en polifenoles y ejercicio aeróbico regular sobre el estrés Oxidativo

En este punto se describe la estrategia analítica para obtener un extracto rico en polifenoles y el protocolo de entrenamiento aeróbico regular llevado a cabo en ratones envejecidos. El extracto, previamente obtenido a partir del fruto de calafate, se administró a los animales como parte del estudio.

Para asegurar el cumplimiento de los estándares éticos en la investigación, el proyecto de tesis fue sometido a la evaluación y aprobación del comité de ética de la Universidad de Concepción.

El estudio se enfocó en la comprensión de los efectos sinérgicos de estas intervenciones en un modelo animal envejecido podría tener implicaciones significativas en la prevención y el tratamiento de enfermedades relacionadas con el estrés oxidativo en humanos. Por lo tanto, este enfoque experimental representa un paso importante hacia la identificación de estrategias terapéuticas y preventivas efectivas.

3.3.1 **Obtención de un extracto de calafate rico en polifenoles**

Con el objetivo de evaluar el efecto de una dieta rica en polifenoles en un modelo de estudios de estrés oxidativo, se obtuvo un extracto etanólico de frutos de calafate de acuerdo con el protocolo establecido por Olivares-Caro et al, 2020 ¹⁰². El extracto se caracterizó y cuantificó mediante UHPLC-DAD-QTOF, posteriormente se eliminó el solvente, y se reconstituyó en H₂O_{np}, se midió el pH (~3.5) y se integró a la dieta de los animales de estudio a una concentración de 5mg/mL

Se constituyó un grupo control, (consumió una solución de glucosa y fructosa en concentraciones de azúcares similar a la del extracto y un pH~3.5), y el otro grupo bebió el extracto con las características indicadas previamente. Todos los animales bebieron la solución azucarada o el extracto *ad libitum* durante el tiempo de la intervención cómo se muestra gráficamente en la Figura 3.4Figura 3.3.

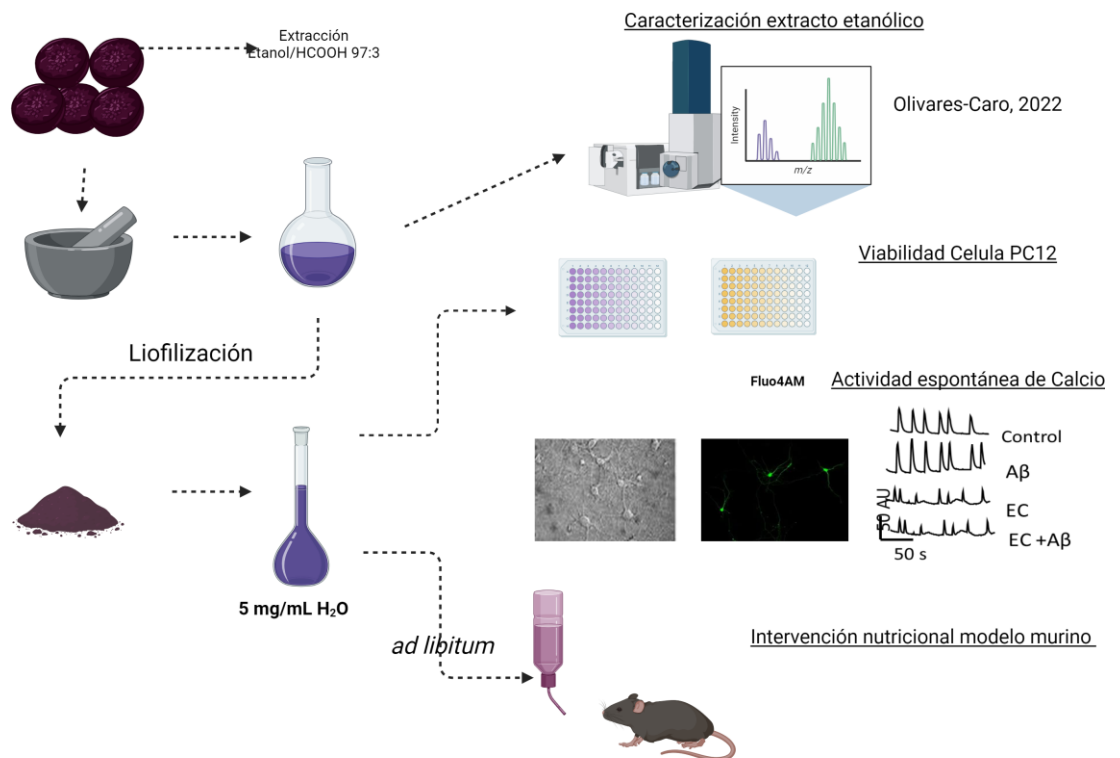


Figura 3.3 Estrategia Analítica de obtención de extracto de calafate.

3.3.2 Obtención modelo murino de entrenamiento aeróbico

Con el objetivo de evaluar el efecto del ejercicio en el estrés oxidativo, se desarrolló un modelo de estudio en ratones envejecidos (todos los ratones tenían más de 6 meses de edad al inicio del tratamiento), quienes se presumía que presentaban un estrés oxidativo acumulado.

Se estimo utilizar un n=5 por cada grupo de estudio, utilizando el método de “ecuación de recurso”¹⁰³.

E = n° total animales – número total de grupos.

E= grados de libertad del análisis de varianza (debe estar entre 10 y 20)

Estos ratones fueron sometidos a un programa de ejercicio aeróbico regular tres veces a la semana durante 30 minutos. El protocolo de ejercicio aeróbico consistió, en resumen, en colocar los animales de estudio en una cinta de correr durante 10 minutos a una velocidad promedio de 11 m/min, con períodos de descanso de 5 minutos, hasta completar un total de 30 minutos de trote. Antes de comenzar la intervención, se evaluaron todos los animales y se seleccionaron los ratones con mayor predisposición a correr para esta intervención ¹⁰⁴, los animales con menos predisposición a correr fueron asignados al grupo control o al grupo que solo consumía el extracto de calafate.

La cinta de correr utilizada en este estudio viene equipada con la opción de aplicar pequeños estímulos eléctricos al final de la cinta, para incentivar a los animales a seguir corriendo. No obstante, en este trabajo, y con el propósito de no causar susto ni estrés adicional a los animales, se optó por un enfoque alternativo. En lugar de utilizar pequeñas descargas eléctricas, se emplearon golpes suaves con un trozo de cartón, los cuales resultaron efectivos durante el estudio.

Por otro lado, el grupo de control, que no fue sometido al ejercicio aeróbico regular, fue colocado al igual que los ratones intervenidos en la cinta de correr junto.

3.3.3 Obtención de modelo murino para evaluar efecto sinérgico de la dieta y el ejercicio

En este punto, se diseñó un modelo murino para investigar si existe un efecto sinérgico entre el consumo del extracto de calafate y el ejercicio aeróbico regular.

Se formó un grupo de animales que recibió suplementación con el extracto de calafate (5mg/mL) ad libitum y se sometió al mismo régimen de ejercicio aeróbico regular descrito anteriormente.



Figura 3.4 Resumen de modelo propuesto de intervención para la evaluación del efecto del ejercicio y el consumo de un extracto rico en compuestos fenólicos en un modelo de estrés oxidativo.

3.3.4 **Obtención de muestras a partir de animales intervenidos**

Después de realizar las intervenciones en los animales, se procedió a obtener muestras de plasma, cerebro e hipocampo para su posterior análisis, llevando a cabo su necesaria detención de metabolismo, primero por inmersión en $N_2(l)$ y luego conservando las muestras a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ garantizando la conservación adecuada de las muestras, asegurando la calidad y estabilidad de los componentes para su posterior análisis. La Figura 3.4 resume el diseño experimental realizado en la intervención.

3.4 Análisis estadístico

Los análisis estadísticos se realizaron en el software estadístico GraphPadPrism, versión 8.4.2. Se evaluó la varianza entre los grupos a través de ANOVA, seguido de pruebas post-hoc de Bonferroni y Tukey, con niveles de significancias de $p < 0.05$ (*); $p < 0.01$ (**) y $p < 0.001$ (***). Los análisis estadísticos para la metadata generada en el estudio metabolómico, se realizaron en Software libre MetaboAnalys 5.0 y el detalle se indica la metodología.

Capítulo 4 Resultados

4.1 Objetivo 1

4.1.1 Artículo 1

En este capítulo se entregan los resultados con los cuales se cumplió el Objetivo 1, y que dio lugar a dos publicaciones.

La primera publicación se titula “**Metabolic profile and antioxidant capacity of five Berberis leaves species: A comprehensive study to determine their potential as natural food or ingredient**”, (10.1016/j.foodres.2022.111642) en esta publicación obtuvimos los siguientes resultados:

La caracterización química de los extractos metanólicos de hojas de distintas Berberis (*B. microphylla*, *B. empetrifolia*, *B. trigona*, *B. metaódarwinii* y *B. vulgaris*) se realizó mediante HPLC-MS/MS. Para los compuestos fenólicos se obtuvo el ión pseudomolecular $[M-H]^-$ y los iones fragmentos, y se realizó una identificación a través de las librerías disponibles como METFRAG, METLIN, HMDB, etc. Los compuestos fenólicos principales fueron los ácidos hidroxicinámicos (HCA) (n=53), ácidos benzoicos (n=18) y flavonoles (n=35).

Además, utilizando la misma corrida cromatográfica, pero con una ionización positiva, fue posible identificar 2 alcaloides presentes en las hojas, Berberina y Jatrorrizina (una protoberberina). Berberina presentó un ión pseudomolecular $[M]^+ [C_{20}H_{18}NO_4]^+$ de 336.1221 m/z y iones fragmentos de 323 m/z por la pérdida de un grupo metil (-CH₃), y 305 por la pérdida de otro grupo metil. A su vez, se encontró la jathrorrizina con un ión pseudomolecular $[M]^+ [C_{20}H_{20}NO_4]^+$ de 338.1378 m/z.

La cuantificación de los principales compuestos fenólicos presentes en los extractos metanólicos se realizaron mediante HPLC-DAD, Los HCAs se identificaron a 320 nm y los flavonoles 360. *B. microphylla* y *B. darwinii* tienen el mayor contenido de HCAs, principalmente de ácido clorogénico, en cambio en los flavonoles los derivados de Quercetina fueron los más abundantes en los distintos extractos de hojas a excepción de *B. vulgaris*. Donde la Isorhamnetina-3.rutinosido fue el flavonoide principal.

La concentración de compuestos fenólicos presentes en los extractos de hojas de los distintos *Berberis* estudiadas, tuvieron directa relación con los ensayos “*in vitro*” que determinaron el contenido de compuestos fenólicos totales (PT), mediante la técnica de Folin-Cicalteau, y las mediciones de capacidad antioxidante a través de los ensayos ORAC,

CUPRAC y ABTS. Los extractos de *B. microphylla* y *B darwinii* presentaron los valores más altos de PT y una mayor capacidad antioxidante en relación al resto de las hojas estudiadas.

En este trabajo se determinó el perfil y contenido de ácidos grasos de todas las hojas mediante GC-MS. Para la identificación se utilizaron los iones 74 y 87 m/z para ácidos grasos saturados o monoinsaturados, y los iones 79 y 81 m/z para los ácidos grasos di o trisaturados. Se identificaron 9 ácidos grasos diferentes con concentraciones que variaron entre 4.84 mg/g PS y 13.96 mg/g PS para *B. microphylla* y *B. vulgaris* respectivamente. El ácido linoleico (ALA) fue el ácido graso más abundante en las muestras. Las hojas *B. microphylla* contenían 2.87 mg/g PS (59,30%) de los ácidos grasos presentes.

Con el exhaustivo análisis realizado a las distintas hojas de *Berberis*, nosotros proponemos que principalmente las hojas de *Berberis microphylla* tiene las condiciones para ser utilizadas como un alimento funcional, pero que requiere más estudios que avalen su efecto en modelos celulares y animales.

A continuación, se adjunta el artículo publicado.



Contents lists available at ScienceDirect

Food Research International

journal homepage: www.elsevier.com/locate/foodres

Metabolic profile and antioxidant capacity of five *Berberis* leaves species: A comprehensive study to determine their potential as natural food or ingredient

Daniela Nova-Baza^{a,b}, Lía Olivares-Caro^a, Luis Bustamante^a, Andy J. Pérez^a, Carola Vergara^a, Jorge Fuentealba^b, Claudia Mardones^{a,c,*}

^a Departamento de Análisis Instrumental, Facultad de Farmacia, Universidad de Concepción, Concepción, Chile

^b Departamento de Fisiología, Facultad de Ciencias Biológicas, Universidad de Concepción, Chile

^c Unidad de Desarrollo Tecnológico, UDT, Universidad de Concepción, Coronel, Chile

ARTICLE INFO

Keywords:

Berberis microphylla leaves
Antioxidant capacity
Metabolic profile
HPLC-QTOF
GC-MS

ABSTRACT

A comprehensive study of bioactive compounds was carried out in the leaves of the main *Berberis* species growing in Chile (*Berberis microphylla*, *Berberis darwinii*, *Berberis empetrifolia*, *Berberis trigona*, and the introduced *Berberis vulgaris*). We identified 117 compounds, by a detailed analysis of each molecule, including phenolic acids, alkaloids, flavonols, and other compounds, using high-performance liquid chromatography and high-resolution mass spectrometry. Quantitative analysis of main compound was also included for all species. Hydroxycinnamic acid derivatives were the main compounds in all the studied leaves, with the highest concentration in *Berberis microphylla*. Quercetin derivatives were the most relevant flavonols in all species, except in *Berberis vulgaris*, in which isorhamnetin-3-rutinoside was the most concentrated. The fatty acid profile, determined by gas chromatography mass spectrometry revealed the presence of linoleic and linolenic acids in all species studied. *Berberis vulgaris* showed higher levels of these fatty acids. The antioxidant capacity, explored by three in vitro methods, showed high values for all studied *Berberis* species. The obtained levels are higher than those of other prominent foods. The findings will inform novel approaches for the valorization of these leaves as natural food or ingredient.

1. Introduction

The Berberidaceae family is composed of 15 genera and approximately 650 species (Landrum, 1999). The research interest in this family stems the descriptions of several family members as potential sources of bioactive compounds, mainly alkaloids in roots and phenolic compounds in fruits (Ruiz, Zapata, et al., 2014). Sixty species have been described in South America of which 20 are found in Argentina and Chile, and half of these are endemic to Chile (Landrum, 1999).

Berberis microphylla G. Forst (commonly known as Calafate, Michay, or Mulun) is the most extensively distributed *Berberis* species in southern Patagonia, at latitudes between 35°10 and 54°40 S (Marticorena & Rodríguez, 2003). It is an endemic wild growing shrub, with a height of 1 or 2 m. It grows in humid areas of the steppe, coastal thickets, edges and gaps of the *Nothofagus* forests, and along streams and rivers

(Arena et al., 2020). Their leaves are grouped in rosettes, vary considerably in size, and are obovate or oblanceolate (40–60 × 2–14 mm); they are opaque to slightly lustrous with one or two perpendicular teeth per side, a prominent middle nerve, and two or three ascendant lateral nerves (Marticorena & Rodríguez, 2003). These plants have been used, since prehispanic times, in traditional medicine to treat fever, inflammation, stomach ache, diarrhea, urinary tract infection, throat infection, gingivitis, and liver problems (Schmeda-Hirschmann et al., 2019).

High concentration of isoquinoline alkaloids have been reported in Calafate leaves. The compounds include berberine, jatrorrhizine and palmatine (Ruiz, Zapata, et al., 2014). However, to the best of our knowledge, information about other bioactive compounds has not been published. In a recent study, nutrients, including carbon (C), nitrogen (N), phosphorus (P), and potassium (K), and chlorophyll content were determined in leaves, in relation to irradiation and fertilization (Arena

* Corresponding author.

E-mail addresses: daninova@udec.cl (D. Nova-Baza), lialivares@udec.cl (L. Olivares-Caro), lbustamante@udec.cl (L. Bustamante), aperez@udec.cl (A.J. Pérez), carolavergara@udec.cl (C. Vergara), jorgefuentealba@udec.cl (J. Fuentealba), cmardone@udec.cl (C. Mardones).

<https://doi.org/10.1016/j.foodres.2022.111642>

Received 30 March 2022; Received in revised form 3 July 2022; Accepted 5 July 2022

Available online 9 July 2022

0963-9969/© 2022 Elsevier Ltd. All rights reserved.

et al., 2020). However, phenolic, or fatty acid compounds have not been reported in *Berberis* leaves. These compounds are beneficial for human health, with antioxidant, anticarcinogenic, neuroprotective, and other bioactivities and benefits for metabolic syndrome (Bhardwaj & Kaushik, 2013).

Berberis empetrifolia (Calafatillo, Grape of mountain, Zarcilla, or Black mountain), *Berberis darwinii* (Michay, Quelung), and *Berberis trigona* (Calafate, Michay) are other wild species of the Berberidaceae family from the Chilean Patagonia. All species are widely distributed along the southern half of Chile. *Berberis empetrifolia* grown between 30°08 and 55°05 S, is a dwarf shrub that reaches up to 50 cm, with acicular leaves (5–18 × 1–1.2 mm). *Berberis darwinii* is a large and well-branched shrub that grows between 33°25 and 46°40 S, with obovate, oblanceolate, or elliptical leaves (14–30 × 5–14 mm). *B. trigona* grows between 35°51 and 41°06 S, with elliptic, oblanceolate, or linear leaves (17–54 × 4–15 mm) (Marticorena & Rodriguez, 2003). *Berberis vulgaris* is an extensively distributed plant worldwide. In Chile, it is commonly used as an ornamental plant. Several studies conducted globally have demonstrated its use as a medicinal plant, based mainly on the presence of berberine in roots, stems, and fruits (Ruiz, Zapata, et al., 2014).

Only a few studies have characterized *Berberis* leaves collected from other latitudes. One study evaluated *Berberis hispanica* Boiss. & Reut., the Spanish *Berberis* and detected twenty-six compounds, most of which were hydroxycinnamic acid derivatives (HCADs) (Fernández-Poyatos et al., 2020). The study revealed that the methanolic and aqueous extracts of its leaves exhibited high antiradical activity which confirmed their bioactive potential (Fernández-Poyatos et al., 2020). Another study involving *Berberis iliensis* M. Pop., a widespread *Berberis* in Kazakhstan, detected 23 compounds in the leaves. They included phenolics and alkaloids, among other metabolites. The study described a high antiradical activity and moderate antimicrobial activity against gram-positive microorganisms and yeasts (Abdykerimova et al., 2020).

The purpose of our research was to study the metabolic profile, including phenolic, alkaloid, fatty acid and other compounds, of Calafate leaves and other *Berberis* (*B.*) species and their antioxidant capacity in order to valorize these leaves as sources of diverse bioactive compounds for the food/nutraceutical industries. The study, carried out by high performance liquid chromatography with a diode detector coupled to quadrupole time-of-flight mass spectrometry (HPLC-QTOF-MS/MS) and gas chromatography mass spectrometry (GC-MS/MS) included a detailed analysis of each molecule in order to assign identities and reveal the phytochemical potential of leaves from these plants.

2. Materials and methods

2.1. *Berberis* leaves

B. microphylla leaves were collected from Chilean Patagonia, near the Coyhaique regions (45°34'30.9" S and 72°3'58.3" W). *B. darwinii*, *B. empetrifolia*, and *B. trigona* were collected near Pucón, Chile (39°16'12.83" S, 71°47'25.8" W). *B. vulgaris* was obtained from University of Concepción Campus (36°49'44.65" S, 73°2'12.8" W). All samples were kept frozen (–20 °C) until their analyses. Sample taxonomic classification was made by comparing the specimens with those from the University of Concepción Herbarium with the help of Dr. Roberto Rodriguez^{RIP}. Three samples were collected from each species.

2.2. Reagents and standards

Commercial standards of 3-cafeoylquinic acid, quercetin-3-rhamnoside, quercetin-3-glucoside, protocatechuic acid, berberine hydrochloride (<90%), neocuproine hemihydrate, CuCl₂, 6-hydroxy-2,5,7,8-tetramethylchroman-2-carboxylic acid (Trolox), gallic acid, 2,2-azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid) (ABTS), fluorescein sodium salt, and 2,2-azobis(2-methyl-propionamide)dihydrochloride (AAPH) were obtained from Sigma-Aldrich (Steinheim, Germany).

Formic acid, acetonitrile, methanol, water (HPLC-MS grade or hypergrade), and hexane (SupraSolv®) for gas chromatography were obtained from Merck (Darmstadt, Germany). Chloroform (Optima® GC/MS) was provided by Thermo Fisher Scientific (Waltham, MA, USA). BF₃-methanol 10% LiChropure for fatty acid derivatization, standard fatty acid methyl ester mixes for quantification, miristic acid d27, and Supelco 37 Component fatty acid methyl esters (FAME) mix were purchased from Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA).

2.3. Phenolic compounds extraction

Two grams of leaves were ground in a stainless-Steel mixer with 10 mL of methanol/water (97:3% v/v) and the resulting mixture was treated for 60 s with an ultrasonic bar (Cole-Parmer 130-Watt Ultrasonic Processor; Cole-Parmer, Chicago, IL, USA), followed by 16 h of mechanical shaking (Stuart S01; Bibby Scientific LTD., Stanford, UK). The samples were centrifuged at 1730 g for 10 min (HERAUS FRESCO 17; Thermo Fisher Scientific). The supernatant was removed and stored, and the residual solid was resuspended in 5 mL of the same solvent. The sample was treated for other 60 s with an ultrasonic bar, followed by 30 min of mechanical shaking. The same procedure was carried one more time. The three supernatants were collected in a volumetric flask to a final volume of 25 mL with methanol. A volume of 100 µL of the extract was evaporated by vacuum evaporation using a V-700 vacuum pump and V-850 controller system (Büchi, Flawil, Switzerland). The solid residue was dissolved in 1 mL of a mobile phase of 0.1% formic acid in water/acetonitrile (85:15%, v/v) for chromatographic analysis by LC-MS, with exception of the *B. darwinii* residue which was dissolved in 650 µL of the mobile phase.

2.4. LC-MS analysis

The HPLC-DAD-QTOF-MS/MS Compact (Bruker Daltonics GmbH, Bremen, Germany) was used to identify phenolic compounds and other metabolites in leaves and for quantitative analyses. Instrument control and data collection were carried out using Compass DataAnalysis 4.4 SR1 (Bruker Daltonics GmbH). The mass spectrometer was operated in both ESI positive and negative acquisition modes, in a mass range of 50 to 1500 *m/z*, with a scan duration of 0.2 sec and collected data in centroid mode. The collision energy was set in a variable range between 10 and 25 eV in the stepping mode. The source parameters were set as follows: end plate offset 500 V, capillary voltage of 3500 V for –ESI and 4500 V for + ESI; nebulizer pressure 4 bar; dry gas flow 9 L/min; and dry temperature of 200 °C. The conditions for the auto MS/MS were set as follows: four precursors/cycle and active exclusion after one spectrum. Internal calibration with sodium formiate (10% formic acid, 1 M), with mass accuracy < 3 ppm. MS detection was performed using a base peak chromatogram (BPC). The assignment of identity was carried out using PUBCHEM, METFRAG, METLIN, HMDB, and KEGG databases, according to a previously published definition (Fiehn et al., 2007). The MS data were also compared with those of other publications.

Chromatographic separation was performed using a C18 column (Kromasil 250 mm × 4.6 mm × 5 µm) with a C18 precolumn (Nova-Pak; 22 mm × 3.9 mm × 4 µm; Waters, Milford, MA, USA) at 30 °C. The mobile phase consisted of 0.1% formic acid in water and acetonitrile at a flow rate of 0.3 mL/min. The acetonitrile gradient ranged from 15% to 25% for 14 min, 25% to 35% for 11 min, 35% to 100% for 1 min, and 100% to 15% for 1 min, with a stabilization period of 25 min. The injection volume was 10 µL in partial loop mode (45 µL are measured and 10 of them are co-injected with solvent).

Quantitative analysis was carried out with DAD (diode array detector) detection by external calibration by using 3-cafeoylquinic acid and quercetin-3-glucoside standards for HCADs and flavonols, respectively. The signals were extracted at 360 nm for flavonols and 320 nm for HCADs. The concentrations are expressed as µmol/g dry weight (DW).

2.5. Fatty acid sample treatment

The extraction consisted in 50 mg of the sample mixed with 1 mL of methanol/chloroform 2/1% v/v solution were transferred to a 1.5 mL centrifuge tube and shaken (ball mill 30 cycles/s for 1.5 min), followed by centrifugation (9600 g for 2 min at 4 °C). The resulting supernatant (780 µL), chloroform (260 µL), and water (468 µL) were transferred to a 4 mL vial and vortexed. Finally, 400 µL of the organic phase was transferred to a new 4 mL glass vial and evaporated under a nitrogen stream for derivatization. FAME derivatization was achieved using the AOAC 969.33 protocol for fatty acids as previously described (Pino Ramos et al., 2019) with Myristic-d-27 acid (75 mg/L) as the internal standard.

2.6. GC-MS/MS fatty acid profile

The analysis was performed using a model 7890A GC device (Agilent, Palo Alto, CA, USA) with a multimode injector interfaced to an Agilent 7000 GC/MS Triple Quad detector, fitted with an Agilent CTC PAL autosampler, and controlled by Agilent MassHunter GC/MS acquisition software (Version B.05.00/Build 5.0.291.0). The chromatographic analysis was carried out using a 30 m × 0.25 mm × 0.2 µm ionic liquid SLB-IL-111 column (Supelco, Bellefonte, PA, USA). The injection volume was 1 µL, injection temperature was 250 °C, split mode was 10:1, and gas carrier flow was 1.5 mL/min. The oven temperature program started at 40 °C for 4 min, with a 5 °C/min ramp up to 260 °C for a total analysis time of 48 min. The transference line was set at 275 °C with an ionization source of 70 eV and 230 °C with a quadrupole temperature of 150 °C. Mass spectra acquisition was performed in scan mode from 20 to 450 *m/z*, with a scan time of 140 ms. Fatty acids were identified by comparing the retention times (*t_R*) with a FAME mix, mass spectra, and NIST05 library. The extracted ions at *m/z* 74 and 87 were used for saturated and monounsaturated fatty acids, respectively. The ions at *m/z* 79 and 81 were used for the di- and tri-unsaturated fatty acids (Pino Ramos et al., 2019). The areas corrected by the internal standard of the samples and the standard mix (Supelco pn: CRM47885, XA18647V) were compared by applying a response factor method, according to the AOAC 996.06. The concentrations of the different fatty acids are expressed as mg/g DW.

2.7. Antioxidant capacity and total phenolic compounds

The TEAC_{CUPRAC}, TEAC_{ABTS} and GAE_{FOLIN} assays were carried out in transparent 96-well microplates (Trueline, TR5003 96 wells). TEAC_{ORAC} used Corning® 96 Well Black Polystyrene Microplate (Corning 3603). An Epoch™ microplate reader from Biotek Instruments (Winooski, VT, USA) was used for antioxidant assays. The results were expressed as µmol Trolox equivalent (TE) per g DW ± SD for antioxidant assays and mg of gallic acid equivalents (mg GAE) per g DW ± SD for GAE_{FOLIN} (Ruiz, Mardones, et al., 2014; Olivares-Caro et al., 2020; Ou et al., 2013).

2.7.1. TEAC_{CUPRAC}

The Berberis sp extracts were evaluated by means of the Cu(II) Neocuproin complex reaction: 50 µL of 10 mM CuCl₂ were added to each well, then 50 µL of Neocuproin (7.5 mM) and 50 µL of buffer CH₃COONH₄ (1 M) were added, and it was incubated for 15 min at 37 °C. Then 100 µL of each sample (previously diluted in buffer) or calibration curve were added and incubated for 30 min at 37 °C. The lectures were carried out at 450 nm. The antioxidant capacity of the samples were determined by linear regression with a Trolox calibration curve (0–300 µmol/L).

2.7.2. TEAC_{ABTS}

The ABTS stable radical solution was prepared with 38.42 mg of ABTS and 6.9 mg of K₂S₂O₈, were mixed in 10 mL of H₂O nano pure and

stored in the dark for 16 h. The ABTS radical solution was diluted in ethanol until an absorbance of 0.700 ± 0.005 (Shimadzu UV-mini). 190 µL of ABTS stable radical solution was added and immediately measured at 734 nm. Then 10 µL of each extract (previously diluted in ethanol) or trolox calibration curve was added and incubated in the microplate for 20 min at 30 °C until measured at 734 nm. The antioxidant capacity of the samples were determined by linear regression using a Trolox calibration curve (0–200 µmol/L). The method was based on Ruiz et al (Ruiz et al. 2010) modified to microplate format.

2.7.3. TEAC_{ORAC}

The ORAC-Fluorescein was carried out according to the protocol of Ou et al., (Ou et al., 2013). The extracts were previously diluted in buffer ORAC 1X. In each well, 150 µL of fluorescein working solution was mixed with 25 µL of sample or trolox standard. The incubation was in the dark for 30 min at 37 °C and after that, 25 µL of AAPH were added. The kinetics reaction was monitored for 60 min at λ_{ex} 480 nm and λ_{em} 520 nm. The antioxidant capacity was determined by analysis of the area under the kinetics curve (AUC), using a linear regression equation (0–80 µmol/L).

2.7.4. Folin-Ciocalteu

Total phenolic compounds was quantified using the Folin-Ciocalteu method (Ruiz, Hermosín-Gutiérrez, et al., 2010): 50 µL of gallic acid standard or samples (previously diluted in water) were added with 50 µL of Folin reagent and 100 µL of Na₂CO₃ at 6% w/v in each well. The reaction was incubated for 30 min in the dark at 25 °C. Finally, absorbance was measured at 760 nm. Total phenol content was determined by linear regression using a gallic acid calibration curve (0–200 mg/L).

2.8. Statistical analysis

All results were expressed as arithmetic means and standard errors. Data were subjected to one-way analysis of variance (ANOVA) to evaluate the statistical significance of intergroup differences with Bonferroni post hoc tests, considering α < 0.05. Graphics and statistical analysis were performed using GraphPad Prism software version 7.0.

3. Results and discussions

3.1. Identification

The identity of the compounds was assigned by LC-MS in the negative mode. The level of annotation, in almost all cases, was at least level 2, according to the definition of Sumner et al. (Sumner et al., 2007). The main classes of the phenolic compounds detected were HACDs (n = 53), benzoic acid derivatives (n = 18), flavonols (n = 35), alkaloids (n = 2), lignans (n = 2), monoterpenoids (n = 3), and other compounds (n = 4). Several of these compounds have been previously identified in Calafate berries and other Berberis species (Olivares-Caro et al., 2020; Ruiz et al., 2013; Ruiz, Mardones, et al., 2014; Ruiz, Zapata, et al., 2014). However, this is the first report in which the leaf metabolite profile of Berberis has been comprehensively characterized by high-resolution MS. Fig. 1 shows the BPC (intensity vs. time) for each sample. In Supplementary Material (Table S1) are shown the compounds detected in the leaves of the main Berberis species growing in Chile. Detailed descriptions of the compounds annotated according to their molecular ions and their ionic fragments are provided below. Phenolic acids were identified as the most diverse class of phenolic compounds found in Berberis.

3.1.1. Cinnamic acid derivatives

Caffeoylglucaric acid isomers: These isomers were detected in all the Berberis samples (signals 4, 7, 10, 15, see Table S1). The caffeoylglucaric acid isomers (371.0626 *m/z*) [C₁₅H₁₆O₁₁ - H]⁻, showed two major fragments at 209.0303 *m/z* (glucaric acid) [C₆H₁₀O₈ - H]⁻ and 191.0197 *m/z* [C₆H₁₀O₈ - H₂O - H]⁻, and the typical fragments of caffeic acid

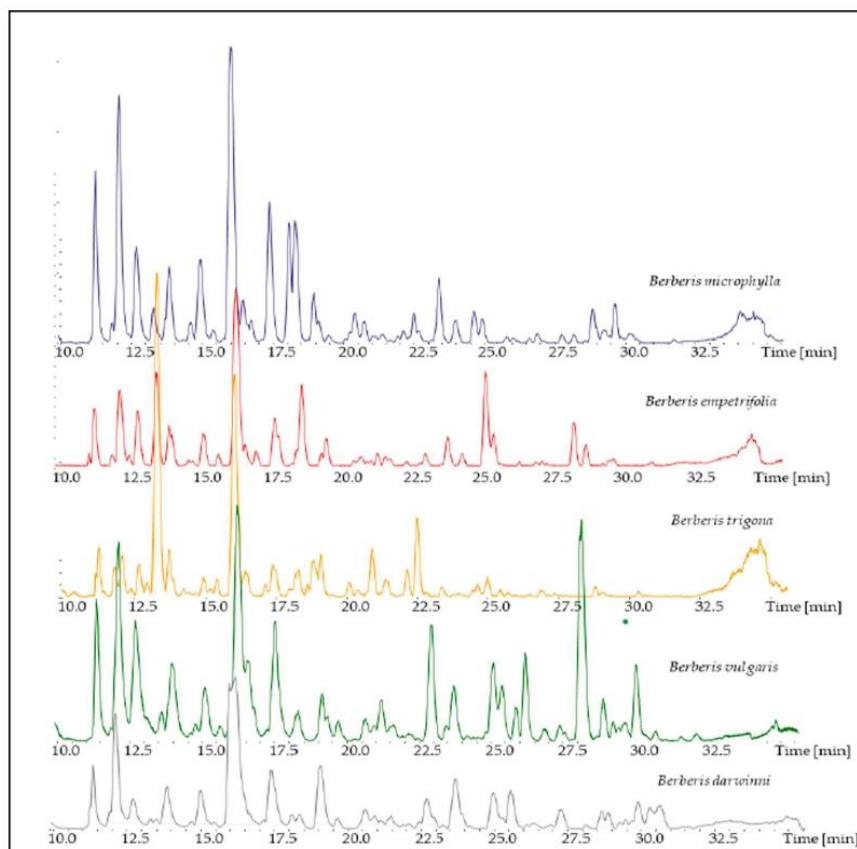


Fig. 1. Base peak chromatograms (HPLC-ESI-QTOF) of Berberis leaves extracts.

179.0350 m/z [$C_9H_8O_4 - H$]⁻ and 135.0452 m/z [$C_9H_8O_4 - COO - H$]⁻. These compounds were assigned as 3 or 4 *trans*-caffeoylglucaric acid and 2 or 5 *trans*-caffeoylglucaric acid in *B. microphylla*, based on information of structural elucidation carried out previously (Olivares-Caro et al., 2020; Ruiz, Mardones, et al., 2014). The fragments 129.0193 m/z and 173.0092 m/z have been found in glucaric acid fragmentation but were not explained (METLIN).

Caffeoylquinic acid isomers: Caffeoylquinic acid isomers (353.0862 m/z) [$C_{16}H_{18}O_9 - H$]⁻ showed fragments: 191.0561 m/z (quinic acid) [$C_7H_{12}O_6 - H$]⁻, 179.0350 (caffeic acid) [$C_9H_8O_4 - H$]⁻, 173.0455 [$C_7H_{12}O_6 - H_2O - H$]⁻, 161.0244 [$C_9H_8O_4 - H_2O - H$]⁻ and 147.0299 m/z [$C_9H_8O_4 - COO - H$]⁻. These compounds were detected in all samples (*B. microphylla*, *B. trigona*, *B. empetrifolia*, *B. vulgaris* and *B. darwinii*) and were assigned as caffeoylquinates isomers (signals 13, 30, 32, 53). The peak 32 at 16.1 min was confirmed as 3-caffeoylquinic acid by comparison of retention time with a commercial standard. This acid showed highest signal in all studied Berberis leaves (Olivares-Caro et al., 2020; Ruiz et al., 2013).

Caffeoyl(iso)citric acid isomers: *Berberis microphylla*, *B. trigona*, *B. empetrifolia*, *B. vulgaris* and *B. darwinii* showed the pseudomolecular ion [$M - H$]⁻ of 353.0510 m/z (Christof Björn Steingass et al., 2017) and the fragments ions: 191.0197 m/z [$C_6H_8O_7 - H$]⁻ corresponding to (iso)citrate group for neutral loss of caffeic group, 179.0350 m/z (caffeic acid) [$C_9H_8O_4 - H$]⁻ and 135.0452 m/z [$C_9H_8O_4 - COO - H$]⁻, 161.0244 m/z [$C_9H_8O_4 - H_2O - H$]⁻ corresponding to dehydration caffeoyl (signals 24, 34, 39, 57, 63, 64). These isomers were assigned as caffeoyl(iso)citrate. It is important to indicate that a difference, which is

characteristic between caffeoyl(iso)citrate and chlorogenic acid, is the fragment ion 191.0197 m/z (for (iso)citrate group) which is different to those corresponding to caffeoyl group (191.0561 m/z).

Sideretin hexoside: The pseudomolecular ion [$M - H$]⁻ 385.0765 m/z [$C_{16}H_{18}O_{11} - H$]⁻ was found in all the Berberis (signals 22, 26, 36, 37, 42, 54, 69). The fragment ion 223.0459 m/z [$C_{10}H_7O_6$]⁻ corresponding to the dihydroxyscopoletin group (sideretin), due to the loss hexoside group [$C_{16}H_{18}O_{11} - C_6H_{10}O_5 - H$]⁻. The sideretin was previously recently identify in *Arabidopsis* roots extract (Ziegler et al., 2016). The fragment ion 191.0197 m/z [$C_{10}H_7O_6 - CH_3 - H$]⁻ corresponding to the loss methyl group from sideretin. The fragments 179.0350 m/z due to the decarboxylation from sideretin. This compound was tentatively assigned as sideretin hexoside (Schmidt, 2021).

Caffeoylglucoside isomer: The pseudomolecular ion [$M - H$]⁻ 341.0860 m/z [$C_{15}H_{18}O_9 - H$]⁻ was characteristic of this isomer (Steingass et al., 2015) and was found in all the extracts. Its fragments were 179.0350 m/z [$C_9H_8O_4 - H$]⁻, 161.0244 m/z [$C_9H_8O_4 - H_2O - H$]⁻, 135.0452 m/z [$C_9H_8O_4 - COO - H$]⁻ [$C_8H_8O_2 - H$]⁻, and 117.0346 m/z [$C_8H_8O_2 - H_2O - H$]⁻. This compound was tentatively assigned as caffeoyl-beta-D-glucose isomer (Steingass et al., 2015)(METFRAG).

Rosmarinic acid isomers: The ion molecular [$M - H$]⁻ 359.0758 m/z [$C_{18}H_{16}O_8 - H$]⁻ was found in all the extracts. The fragment ions were typical fragments of caffeic acid (179.0350 m/z , 135.0452 m/z), 109.0295 m/z [$C_6H_6O_2 - H$]⁻ (catechol) and 243.0663 m/z [$C_{14}H_{12}O_4 - H$]⁻ (signals 35, 43). These compounds were tentatively assigned as rosmarinic acid isomers (Sun et al., 2019) a caffeic acid ester.

Dicafeoylglucaric acid isomers: The dicafeoylglucaric acid isomers

were assigned as previously described (Ruiz et al., 2013). The pseudomolecular ion was [M - H]⁻ 533.0926 m/z [C₂₄H₂₁O₁₄ - H]⁻, the base peak [M - H]⁻ 371.0620 m/z [C₁₅H₁₆O₁₁ - H]⁻ corresponding to the loss of the first group caffeoyl [C₉H₈O₄ - H]⁻, and the fragment ion 209.0303 m/z [C₆H₁₀O₈ - H]⁻ (glucaric acid) corresponding to the loss of second group caffeoyl. In addition, other typical fragment of these acids was 191.0197 m/z, representing the dehydration from glucaric acid [C₆H₁₀O₈ - H₂O - H]⁻, and the typical fragments from caffeic acids 179.0350 m/z, 147.0299 m/z [C₉H₈O₄ - COO - H]⁻ and 135.0452. These isomers were detected in Calafate, calafatillo y michay (signals 45, 60, 80, 85, 99, 110). It was not possible to establish the elution order of 2,4; 3,5; 3,4 or 2,5 dicafeoylglucaric acid isomers, despite those previously described by Maas et al 2009 (Maas et al., 2009) in which nuclear magnetic resonance and reverse phase (RP)-HPLC analysis were performed. In our case, because of the different chromatographic conditions, this order could be modified. For this reason, the isomers were tentatively assigned as dicafeoylglucaric acid isomers.

Feruloylquinic acid isomers: The pseudomolecular ion [M - H]⁻ 367.1030 m/z [C₁₇H₂₀O₉ - H]⁻ was detected in all the extracts (signals 41, 70, 73, 89). The characteristic fragment ions were: 191.0561 m/z [C₇H₁₁O₆ - H]⁻ (quinic acid) for loss of the ferulic acid group [C₁₀H₁₀O₃], 193.0506 m/z [C₁₀H₁₀O₄ - H]⁻ (ferulic acid), 149.0608 m/z [C₉H₁₀O₂ - H]⁻ for loss COO⁻ from ferulic acid [C₁₀H₁₀O₄ - H - COO]⁻ [C₉H₁₀O₂ - H]⁻ and the subsequent demethylation [CH₃]⁻ formed the fragment ion 134.0373 m/z [C₉H₁₀O₂ - CH₃ - H]⁻; 179.0350 m/z [C₁₀H₁₀O₄ - CH₃ - H]⁻, 161.0244 [C₁₀H₁₀O₄ - CH₃ - OH - H]⁻. These compounds were assigned as feruloylquinic acid isomers (Ruan et al., 2019).

Coumaroylquinic acid isomers: The pseudomolecular ion [M - H]⁻ 337.0923 m/z [C₁₆H₁₈O₈ - H]⁻ was detected in all the extracts (signals 31, 62, 92). Its fragment ions were: 191.0561 m/z [C₇H₁₁O₆]⁻ (quinic acid) for loss of coumaric acid; 163.0401 m/z [C₉H₇O₃ - H]⁻ for loss of quinic acid and 173.0455 m/z [C₇H₁₀O₅ - H]⁻ (quinic moiety). The compounds were assigned as coumaroylquinic acids (Steingass et al., 2017).

Coumaroyl(iso)citric acid isomers: The pseudomolecular ion [M - H]⁻ 337.0568 m/z [C₁₅H₁₄O₈ - H]⁻ was detected in *B. microphylla*, *B. trigona*, *B. empetrifolia*, and *B. darwinii* (signals 67 and 95). Its fragment ions were: 191.0197 m/z [C₆H₈O₇ - H]⁻ ((iso)citrate group), which is explained for loss of coumaric acid. Similarly, the fragment ion 163.0401 m/z [C₉H₈O₃ - H]⁻ (coumaroyl group) was produced for loss of (iso)citrate group. Finally, a fragment of 145.0295 m/z [C₉H₈O₃ - H₂O - H]⁻ (coumaroyl moiety) was detected. The difference with coumaroylquinic acid is the fragment 191.0197 m/z, typical of (iso)citrate group.

Dicafeoylisocitric acid isomer: The pseudomolecular ion [M - H]⁻ [C₂₄H₂₀O₁₃ - H]⁻ 515.0835 m/z was detected in all the Berberis (signal 88) with fragment ions 353.0514 m/z [C₁₅H₁₃O₁₀ - H]⁻ corresponding to caffeoyl(iso)citrate group; 191.0197 m/z [C₆H₇O₇ - H]⁻ ((iso)citrate); 161.0244 m/z [C₉H₆O₃ - H]⁻ (caffeoyl moiety) and 179.0350 m/z [C₉H₇O₄ - H]⁻ (caffeic acid group).

Sinapic acid hexoside isomer: The pseudomolecular ion [M - H]⁻ 385.1126 m/z [C₁₇H₂₂O₁₀ - H]⁻ was detected in *B. microphylla*, *B. trigona* and *B. vulgaris* (signal 44). The fragment ions were 265.0718 m/z [C₁₇H₂₂O₁₀ - C₄H₇O₃ - OH - H]⁻, for moiety from hexoside group, 223.0618 m/z [C₁₁H₁₂O₅ - H]⁻ (Sinapic acid) (Cabañas-García et al., 2019; Elsadig Karar & Kuhnert, 2016), 175.0037 [C₁₁H₁₂O₅ - CH₃ - OH - H]⁻ (Steingass et al., 2015). This compound was assigned as sinapic acid hexoside isomer.

Feruloyl(iso)citric acid isomers: The pseudomolecular ion [M - H]⁻ 367.0664 m/z [C₁₅H₁₆O₁₀ - H]⁻ was detected in *B. microphylla*, *B. vulgaris* and *B. darwinii* (signals 71, 115, 130, 137, 150). Its fragment ions were: 161.0244 m/z for demethylation and dihydroxylation from the ferulic acid [C₁₀H₁₀O₄ - CH₃ - OH - H]⁻, 133.0282 m/z [C₁₀H₁₀O₄ - COO - CH₃ - H]⁻. These isomers were assigned as feruloyl(iso)citric acids (Steingass et al., 2017).

Dicafeoylquinic acid isomers: The pseudomolecular ion [M - H]⁻

515.1171 m/z [C₂₅H₂₄O₁₂ - H]⁻ was found in *B. microphylla*, *B. empetrifolia*, *B. vulgaris* and *B. darwinii* (signals 79, 81, 143, 154) with fragments ions 353.0878 m/z [C₁₆H₁₈O₉ - H]⁻ corresponding to caffeoylquinic acid, 191.0561 m/z [C₇H₁₀O₆ - H]⁻ corresponding to quinic acid, 173.0455 m/z [C₇H₁₀O₅ - H]⁻ (quinic acid moiety) and the fragments 179.0350 m/z and 135.0452 m/z, the typical fragments from caffeic acids. These compounds were assigned as dicafeoylquinic acid based in standard and bibliography (Olivares-Caro et al., 2020).

Caffeoylshikimic acid isomer: The pseudomolecular ion [M - H]⁻ [C₁₆H₁₆O₈ - H]⁻ 335.0769 m/z was detected in all the Berberis (signal 101), with the typical fragment ions from caffeic acid at 179.0350 m/z, 135.0452 m/z and 161.0244 m/z [C₉H₈O₄ - H₂O - H]⁻. This compound was assigned as caffeoylshikimic acid isomer (Elsadig Karar & Kuhnert, 2016).

Sinapoyl glucuronide isomer: The pseudomolecular ion [M - H]⁻ 399.0933 m/z [C₁₇H₁₉O₁₁ - H]⁻, was detected in *B. microphylla*, *B. vulgaris* and *B. darwinii* (signal 76), with fragment ions at 191.0562 m/z [C₁₇H₁₉O₁₁ - C₆H₈O₆ - CH₃O - H]⁻ (demethoxylated sinapic acid) [C₁₀H₇O₄]⁻, 179.0350 m/z [C₁₀H₇O₄ - COO]⁻ decarboxylation from sinapic acid, 161.0244 m/z [C₁₀H₇O₄ - OCH₃]⁻, demethoxylation from sinapic acid. This compound was assigned as sinapic acid glucuronide isomer (Mekky et al., 2019).

3.1.2. Benzoic acid derivatives

Syringic acid hexoside isomer: The isomer was abundant in *B. trigona*, *B. empetrifolia*, *B. microphylla*, *B. vulgaris* and *B. darwinii* (signals 3, 11, 14). The pseudomolecular ion [M - H]⁻ 359.0992 m/z, [C₁₅H₂₀O₁₀ - H]⁻ generated fragment ions 197.0455 m/z [C₉H₁₀O₅ - H]⁻ (syringic acid) for the loss of hexoside, fragment 179.0350 due to dehydration of syringic acid [C₉H₁₀O₅ - H₂O - H]⁻ and fragment 153.0557 m/z corresponding to the loss of COO from syringic acid [C₉H₁₀O₅ - COO - H]⁻. These compounds were identified as syringic acid hexosides based on fragmentation in silico and previous reports (Elsadig Karar & Kuhnert, 2016).

Vanillic acid hexoside isomers: The pseudomolecular ion [M - H]⁻ 329.0889 [C₁₄H₁₈O₉ - H]⁻ was detected in all the Berberis (signals 1 and 18). The fragments were 167.0350 m/z [C₈H₈O₄ - H]⁻ (vanillic acid), 108.0217 m/z [C₈H₈O₄ - CH₃ - COO - H]⁻ (demethylated and decarboxylated vanillic acid), and 152.0115 m/z [C₈H₈O₄ - CH₃ - H]⁻ (demethylated vanillic acid). This compound was tentatively assigned as vanillic acid hexoside, based on a previous report (Chamorro et al., 2019).

Dihydroxybenzoic acid hexoside isomer: All extracts of Berberis showed signal at 11.1 min with the pseudomolecular ion [M - H]⁻ 315.1083 m/z [C₁₄H₂₀O₈ - H]⁻ (signal 2) and a fragment ion at 153.0193 [C₁₄H₂₀O₈ - C₆H₁₀O₅ - H]⁻ by loss of a hexoside. This compound was tentatively identified as dihydroxybenzoic acid hexoside. The pseudomolecular ion [M - H]⁻ 315.0718 m/z, [C₁₄H₂₀O₈ - H]⁻ eluted at 11.8 min in samples from *B. microphylla*, *B. trigona*, *B. darwinii*, *B. vulgaris* and *B. empetrifolia* (signal 5) produced the same fragment ion at 153.0193 m/z attributable to the loss of a hexoside, and 109.0295 m/z [C₈H₁₀O₃ - COO - H]⁻ obtained by neutral loss of a hexose moiety followed by the neutral loss of COO (44 Da). This compound was annotated as 3,4-dihydroxybenzoic (protocatechuic acid hexoside) as its exact mass was very similar to that described in the previous report of this compound (Elsadig Karar & Kuhnert, 2016).

Hydroxybenzoatehexoside isomer: The pseudomolecular ion [M - H]⁻ 299.0769 m/z [C₁₃H₁₆O₈ - H]⁻ was identified in all the extracts (signal 20). The fragment ions were 137.0244 [C₁₃H₁₆O₈ - C₆H₁₁O₅ - H]⁻, corresponding to benzoate, produced by the loss of a glucoside molecule and 119.0139 m/z [C₇H₅O₃ - H - OH]⁻ corresponding to the loss of hydroxide from benzoate (Mekky et al., 2015).

Pleoside isomer: The pseudomolecular ion [M - H]⁻ 343.1040 m/z [C₁₅H₂₀O₉ - H]⁻ was found in all the Berberis at 15.9 min (signal 28). The fragment ions were: 181.0506 corresponding to loss of glucose [C₁₅H₂₀O₉ - C₆H₁₂O₆ - H]⁻. This compound was tentatively identified as

pleoside, a phenolic glycoside that also been detected in *Artemisa copa Phil* (Astareceae) (Larrazabal-Fuentes et al., 2020).

Coniferin isomers: The pseudomolecular ion $[M - H]^-$ 341.1234 *m/z*, $[C_{16}H_{22}O_8 - H]^-$ was detected in *B. microphylla* and *B. empetrifolia* (signals 51 and 58). The fragment ions were: 179.0714 *m/z* $[C_{16}H_{22}O_8 - C_6H_{10}O_5 - H]^-$ $[C_{10}H_{11}O_3]^-$ (Coniferyl alcohol) due to the loss of the hexoside, 121.0295 *m/z* $[C_{10}H_{11}O_3 - C_3H_5O - H]^-$ $[C_7H_6O_2 - H]^-$ coniferyl alcohol without a 3-Hydroxy-1-propenyl and one H, and 136.0530 *m/z* $[C_{10}H_{11}O_3 - C_2H_4O - H]^-$. These isomers were assigned as hexoside of coniferyl alcohol (coniferin), another phenolic glycoside that has been described in asparagus and other vegetables (HMDB) (Feussner et al., 2014).

Benzyl alcohol-hexose-pentose: The pseudomolecular ion $[M - H]^-$ 401.1466 *m/z* $[C_{18}H_{26}O_{10} - H]^-$ was found in *B. empetrifolia* and *B. darwinii* at 18.4 min (signal 46). The fragment ions were: $[M - H]^-$ 269.1031 *m/z* $[C_{13}H_{26}O_{10} - C_5H_8O_4 - H]^-$ $[C_{13}H_{18}O_6 - H]^-$ corresponding to the loss of a pentose and 161.0455 *m/z* corresponding to the hexose due to the loss of benzyl alcohol $[C_{13}H_{17}O_6 - C_7H_7O - H]^-$. Based on this fragmentation this compound was tentatively assignment as Benzyl alcohol-hexose-pentose (Elsadig Karar & Kuhnert, 2016). The molecular ion $[M - H]^-$ 447.1521 *m/z* was identified as [benzil-alcohol-hexose-pentose + HCOO - H]⁻, corresponding to an adduct product, as it has been detected in the same samples at the same retention time and with similar fragmentation pater (signal 47). It was identified as [benzil-alcohol-hexose-pentose + HCOO - H]⁻ corresponding to an adduct product.

Propanedioic acid, [5-[[2-[(6-deoxy-α-L-galactopyranosyl) oxy] cyclohexyl] oxy]-Pentyl] isomer: The pseudomolecular ion $[M - H]^-$ 433.2085 *m/z* $[C_{13}H_{26}O_{15} - H]^-$ was detected in all the extracts (signals 52, 61, 65, 74, 103). The fragment was 387.2024 *m/z* corresponding to the loss of the CH₂O₂ group $[C_{13}H_{38}O_{15} - CH_2O_2 - H]^-$. This compound was tentatively assigned as propanedioic acid, [5-[[2-[(6-deoxy-α-L-galactopyranosyl) oxy] cyclohexyl] oxy]-Pentyl] (Cabañas-García et al., 2019).

3.1.3. Flavonoids

The flavonoids (C₆C₃C₆) were divided into subgroups based on the carbon of the C ring on which the B ring is attached and the degree of unsaturation and oxidation of the C ring (Panche et al., 2016). Isoflavones are flavonoids in which the B ring is linked to position 3 of the C ring. Neoflavonoids have a B ring linked at position 4, while those in which the B ring is linked at position 2 are further subdivided into several subgroups based on the structural features of the C ring. The subgroups include flavones, flavonols, flavanones, flavanonols, flavanols or catechins, anthocyanins, and chalcones (Panche et al., 2016).

3.1.3.1. Isoflavones. Irisolidone isomer: The pseudomolecular ion $[M - H]^-$ 313.0702 *m/z*, with the molecular formula $[C_{17}H_{14}O_6 - H]^-$ was found in *B. microphylla* and *B. empetrifolia* at 26.9 min (signal 123). A fragment ion of 267.0663 *m/z* corresponded to the loss of the methoxy group and methyl group $[C_{17}H_{14}O_6 - OCH_3 - CH_3 - H]^-$. This compound was tentatively assigned as the irisolidone isomer and has been recently quantified in rhizomes of four *Ukrainian Iris sp.*, a perennial herbaceous plants distributed in Europe, northern Africa, Asia, and the Middle East (Mykhailenko et al., 2020).

3.1.3.1.1. Flavones. Apigenin-hexoside isomers: The pseudomolecular ion $[M - H]^-$ 431.0970 *m/z* $[C_{21}H_{20}O_{10} - H]^-$ was detected in *B. microphylla*, *B. empetrifolia*, *B. trigona*, *B. vulgaris* and *B. darwinii* (signals 91, 97, 149, 152, 168). The fragment ions were at 268.0377 *m/z*, corresponding to the loss of hexoside $[C_{21}H_{20}O_{10} - H - C_6H_{12}O_6 - H]^-$ characteristic of apigenin 7-O-glucoside (Serag et al., 2019). In *B. trigona* and *B. darwinii* (signal 91) the molecular ion $[M - H]^-$ 431.0985 *m/z* $[C_{21}H_{20}O_{10} - H]^-$ with the fragment ion 311.0561 is characteristic of apigenin-6 or 8- glucoside produced for the loss neutral of $[C_4H_8O_4]$ (Elsadig Karar & Kuhnert, 2016). These compounds were assigned as

apigenin-hexosides due to the pater fragmentation.

Apigenin-rutinoside: The pseudomolecular ion $[M - H]^-$ 577.1565 *m/z* $[C_{27}H_{30}O_{14} - H]^-$, was found only in *B. darwinii* at 26.5 min (signal 119), with a fragment ion of 269.0455 *m/z*, corresponding to aglycone apigenin, produced for the neutral loss of rutinoside $[C_{27}H_{30}O_{14} - C_{12}H_{20}O_9 - H]^-$. This compound was tentatively assigned as apigenin-rutinoside.

Limocitrol-O-glucoside isomers: The pseudomolecular ion $[M - H]^-$ 537.0989 *m/z* $[C_{24}H_{26}O_{14} - H]^-$, present in *B. microphylla*, *B. vulgaris* and *B. darwinii* (signals 144 and 155), with a fragment ion of 375.0663 *m/z*, corresponding to aglycone, produced for the loss of hexoside $[C_{24}H_{25}O_{14} - C_6H_{10}O_5 - H]^-$. These compounds were tentatively assigned as limocitrol-O-glucoside isomers (El-Sayed et al., 2017).

3.1.3.1.2. Flavonols. Quercetin-rutinoside isomer: The pseudomolecular ion $[M - H]^-$ 609.1468 *m/z* $[C_{27}H_{30}O_{16} - H]^-$ was present in all the extracts at 22.5 min (signal 78). The fragment ions were: 301.0354 *m/z* $[C_{15}H_{10}O_7 - H]^-$ (aglycone quercetin), 178.9986 *m/z* $[C_8H_4O_5 - H]^-$ corresponding to the retrocyclization of quercetin (Čirić et al., 2012) and 151.0037 *m/z* $[C_7H_4O_4 - H]^-$ for loss of $[CO]$. This compound was assigned as quercetin-3-rutinoside based on its retention time and mass spectra which in agreement with those reported in a previous study (Olivares-Caro et al., 2020).

Quercetin-rhamnoside isomer: The pseudomolecular ion $[M - H]^-$ 447.0931 *m/z* $[C_{21}H_{20}O_{11} - H]^-$ was detected in *B. microphylla*, *B. vulgaris* and *B. darwinii* at 28.9 min (signal 145) with fragments 301.0354 *m/z* $[C_{15}H_9O_7]^-$ (quercetin aglycon) and 151.0037 *m/z* $[C_7H_4O_4 - H]^-$ (Čirić et al., 2012). The fragments at 271.0248 *m/z* and 255.0299 *m/z* were found in quercetin-rhamnoside fragmentation, but were not explained (METLIN, HMDB). The ion $[M - H]^-$ 515.0811 *m/z* (signals 146), would be corresponding at $[C_{21}H_{20}O_{11} + HCOONa]^-$. Thus, this compound was tentatively assigned as quercetin-rhamnoside.

Quercetin-hexoside isomers: The pseudomolecular ion $[M - H]^-$ 463.0883 *m/z* $[C_{21}H_{20}O_{12} - H]^-$ was detected in *B. microphylla*, *B. trigona*, *B. empetrifolia*, *B. vulgaris*, and *B. darwinii* (signals 102, 104). The typical fragmentation pattern of quercetin-hexoside was observed for these isomers: 301.0354 *m/z* $[C_{15}H_{10}O_7 - H]^-$, 271.0248 *m/z* corresponding to $[C_{15}H_9O_7 - CHO - H]^-$ and 255.0299 *m/z* corresponding to $[C_{15}H_9O_7 - COOH - H]^-$ (Chamorro et al., 2019). Considering previous information concerning the mass spectra and the observed elution order, the compounds were annotated as quercetin-3-glucoside and quercetin-3-galactoside respectively (Olivares-Caro et al., 2020; Ruiz, Zapata, et al., 2014).

Quercetin-malonylhexoside isomer: The pseudomolecular ion $[M - H]^-$ 549.0905 *m/z* $[C_{24}H_{21}O_{15} - H]^-$ was detected in *B. microphylla* and *B. darwinii* at 26.6 and 27.3 min (signals 120 and 131). The fragment ions were at 463.0882 *m/z* $[C_{21}H_{19}O_{12} - H]^-$ (quercetin-glucoside), 301.0354 $[C_{15}H_{10}O_7 - H]^-$ (quercetin aglycone) and 271.0248 *m/z* $[C_{14}H_9O_6 - 2H]^-$ (aglycone moiety). Similar to previously reported quercetin isomers, quercetin-3-O-malonylgalactoside and quercetin-3-malonylglucoside were assigned based on previous publications (Olivares-Caro et al., 2020; Ruiz, Zapata, et al., 2014) by coincidence of mass spectra and retention times.

Isorhamnetin-rutinoside isomer: The pseudomolecular ion $[M - H]^-$, 623.1615 *m/z* with molecular formula $[C_{28}H_{34}O_{16} - H]^-$, was detected in *B. microphylla*, *B. empetrifolia* and *B. vulgaris* at 25.8 min (signals 112). The fragment ions were 315.0510 *m/z* $[C_{16}H_{12}O_7 - H]^-$ (isorhamnetin aglycone) (Elsadig Karar & Kuhnert, 2016) and 300.0276 *m/z* $[C_{16}H_{11}O_7 - CH_3 - H]^-$ $[C_{15}H_8O_7]^-$ (demethylated aglycone). This compound also showed the typical fragmentation pattern of isorhamnetin (271/ 255/227) (Li et al., 2016). Based on the coincidence of the mass spectra and retention time, this compound was assigned as isorhamnetin 3-O-(6-O-rhamnosyl)-glucoside, which also has been detected in Calafate fruit (Olivares-Caro et al., 2020).

Isorhamnetin-hexoside isomer: The pseudomolecular ion $[M - H]^-$ 477.1039 *m/z* $[C_{22}H_{22}O_{12} - H]^-$ was detected in *B. microphylla*, *B. empetrifolia*, and *B. vulgaris* (signals 136 and 139). The fragment ions

were at 315.0510 m/z [$C_{16}H_{12}O_7 - H$] (isorhamnetin aglycone) and 300.0276 m/z [$C_{16}H_{11}O_7 - CH_3 - H$] [$C_{15}H_8O_7 - H$] (demethylated aglycone), which exhibited the previously mentioned typical fragmentation pattern of isorhamnetin. Due to the coincidence of the mass spectra and retention time, compound 136 was assigned as isorhamnetin-3-glucoside, while the other isomer (signal 139) was tentatively assigned as isorhamnetin-hexoside (Olivares-Caro et al., 2020).

Kaempferol-hexoside isomer: The pseudomolecular ion [$M - H$] 447.0932 m/z [$C_{21}H_{20}O_{12} - H$] was detected in all the extracts (signals 105, 133, 140, 148, 160). The fragment ions were 285.0405 m/z [$C_{15}H_{10}O_6 - H$] (kaempferol aglycone) for the loss of an hexoside group (Elsadig Karar & Kuhnert, 2016), 257.0455 m/z [$C_{15}H_{10}O_6 - CO - H$] and 151.0037 m/z [$C_7H_3O_4 - H$]. These compounds were tentatively assigned as kaempferol-hexoside isomers because they did not coincide with previous isomers found in Calafate under the same analytic condition (Elsadig Karar & Kuhnert, 2016).

Kaempferol rhamnoside isomer: The pseudomolecular ion [$M - H$] 431.0984 m/z [$C_{21}H_{20}O_{10} - H$] was detected in all the Berberis at 29.4 min (signal 152) with a fragment ion 269.0455 m/z [$C_{21}H_{20}O_{10} - C_6H_{10}O_5 - H$] (kaempferol aglycone). This compound was assignment tentatively like kaempferol rhamnoside (Chamorro et al., 2019).

Kaempferol rutinoid isomer: The pseudomolecular ion [$M - H$] 593.1512 [$C_{27}H_{30}O_{15} - H$] was detected in *B. microphylla*, *B. trigona*, *B. vulgaris* and *B. darwinii* (signals 86, 108). The fragment ions were at 285.0405 m/z [$C_{27}H_{30}O_{15} - C_{12}H_{20}O_9 - H$] [$C_{15}H_{10}O_6 - H$] [kaempferol - H] by the loss of a rutine group and 257.0455 m/z for the loss of the carbonyl group [$C_{15}H_{10}O_6 - CO - H$]. This compound was tentatively assigned as kaempferol rutinoid (Chamorro et al., 2019).

3.1.3.1.3. Flavanones. Plantagoside isomer: The pseudomolecular ion [$M - H$] 465.1031 m/z , [$C_{21}H_{22}O_{12} - H$] was detected in *B. microphylla* and *B. darwinii* (signals 23, 59, 77). The fragment ions were: 303.0510 m/z [$C_{21}H_{22}O_{12} - C_6H_{10}O_5 - H$] [$C_{15}H_{12}O_7 - H$] (loss of glucoside) and 285.0463 m/z [$C_{15}H_{12}O_7 - H_2O - H$] (Nie et al., 2021). This flavanone glycoside was recently detected in seed kernels and hulls of *Paeonia lactiflora* Pall but has not been detected in any Berberis.

Pentahydroxyflavanone: The pseudomolecular ion [$M - H$] 303.0508 m/z [$C_{15}H_{12}O_7 - H$] was present in *B. darwinii*, at 30.3 min (signal 161) with fragment ions at 285.0405 m/z , corresponding to the dehydration from the molecular ion [$C_{15}H_{12}O_7 - H_2O - H$]. The other fragmenting was at 125.0244 m/z , corresponding to a trihydroxybenzene. This compound was tentatively assigned as pentahydroxyflavanone, the aglycone of (Ruan et al., 2019).

3.1.3.1.4. Flavanolignans. Cinchonain 1a isomer: The pseudomolecular ion [$M - H$] [$C_{24}H_{20}O_9 - H$] 451.1028 m/z was detected in *B. microphylla*, *B. vulgaris* and *B. darwinii* (signals 135, 157, 159, 162). The fragment ions were at 341.0667 m/z [$C_{18}H_{14}O_7 - H$] (cinchonain moiety produced by loss one catechol), 109.0295 m/z [$C_6H_6O_2 - H$] (catechol group), and 233.0455 m/z [$C_{12}H_{10}O_5 - H$] (cinchonain moiety due to loss two catechols) (Elsadig Karar & Kuhnert, 2016). These compounds were tentatively assigned as cinchonain 1a isomers.

3.1.4. Lignans

Syringaresinol hexoside isomer: The pseudomolecular ion [$M - H$] 579.2050 m/z [$C_{28}H_{36}O_{13} - H$] was detected in *B. microphylla*, *B. trigona* and *B. darwinii* at 26.9 min (signals 126), with a fragment of 402.1320 m/z [$C_{22}H_{26}O_8 - CH_3 - H$] [$C_{21}H_{23}O_8 - H$] (corresponding to demethylated syringaresinol) (Steingass et al., 2015).

Isolariciresinol hexoside isomer: The pseudomolecular ion [$M - H$] 521.2025 m/z [$C_{26}H_{34}O_{11} - H$] was found in *B. trigona* at 24.0 min (signal 100), with a fragment ion at 359.1500 m/z [$C_{26}H_{34}O_{11} - C_6H_{11}O_5 - H$] [$C_{20}H_{23}O_6$] (isolariciresinol) due to the loss of a hexoside moiety. This compound was tentatively assigned as an isolariciresinol hexoside isomer (Ruan et al., 2019).

3.1.5. Monoterpenoids

Aucubin isomer: The pseudomolecular ion [$M - H$] 345.1191 m/z , [$C_{15}H_{22}O_9 - H$] was found in *B. microphylla* and *B. empetrifolia* at 13.7 min (signal 16) with the fragment ions at 179.0562 m/z [$C_6H_{12}O_6 - H$] (loss of iridoid group) and 137.0608 m/z [$C_9H_{11}O_3 - CHO - H$] (loss of CHO from iridoid) (Sampaio-Santos & Kaplan, 2001).

Mascaroside isomer: The pseudomolecular ion [$M - H$] 523.2200 m/z [$C_{26}H_{36}O_{11} - H$] and fragment ions at 361.1657 m/z [$C_{20}H_{25}O_6 - H$] (naphthofuran moiety produced for loss of glucose) and 346.1422 [$C_{19}H_{22}O_6$] produced by the subsequent demethylation, were characteristic of signal 66 (t_R : 21.2 min). This isomer was detected in *B. microphylla*, *B. trigona*, *B. empetrifolia*, *B. vulgaris* and *B. darwinii*. It was assigned as mascaroside, a terpenoid described in coffee bean (Ducruix et al., 1977).

Gardenoside: Gardenoside was identified at 12.6 min (signal 8) in all the Berberis, with a pseudomolecular ion [$M - H$] 403.1242 m/z [$C_{17}H_{24}O_{11} - H$] and a characteristic fragment ion at 223.0612 m/z [$C_{17}H_{24}O_{11} - C_6H_{12}O_6 - H$], suggesting a neutral loss (hexoside). It has been widely described in *Gardenia fructus* (Neri-Numa et al., 2020).

3.1.6. Other compounds

Furcatin isomers: In *B. empetrifolia* a pseudomolecular ion [$M - H$] 427.1613 m/z [$C_{20}H_{28}O_{10} - H$] (signal 128) with fragment ions at 293.0819 m/z (beta-D-apiofuranosyl-(1->6)-D-glucopyranose group), due to a loss of propen phenyl group, was detected and was tentatively assigned as the furcatin isomer. The signal 129, [$M - H$] 473.1661 m/z , with a fragment ion 427.1610, was tentatively assigned as a formic adduct of furcatin [$C_{20}H_{28}O_{10} + HCOOH - H$] (METFRAG, METLIN). This compound has been found in leaves of *V. furcatum* (Ahn et al., 2004).

Esculin isomer: The pseudomolecular ion [$M - H$] 339.0735 m/z [$C_{15}H_{16}O_9 - H$] was detected in all the Berberis leaves (signal 21) with fragment ion at 177.0193 m/z corresponding to the loss of hexoside from esculin [$C_{15}H_{16}O_9 - C_6H_{10}O_5 - H$] [$C_9H_6O_4 - H$] and the fragment ion at 133.0295 m/z corresponding to the forward decarboxylation [$C_9H_6O_4 - COO - H$]. This compound was tentatively assigned as esculin (Serag et al., 2019). The esculin is a hydroxycoumarin.

Tuberonic acid hexoside: The pseudomolecular ion [$M - H$] 387.1663 m/z [$C_{18}H_{28}O_9 - H$] was detected in *B. vulgaris* (signal 48), with a fragment ion at 207.1027 m/z [$C_{18}H_{28}O_9 - C_6H_{11}O_6 - 2H$] [$C_{12}H_{15}O_4$], characteristic that corresponding to the loss of hexoside group, 163.1128 m/z [$C_{12}H_{15}O_4 - COO$] corresponding to the forward decarboxylation. This compound was tentatively assigned as tuberonic acid hexoside (Mekky et al., 2015).

3.1.7. Unidentified compounds

Several compounds were unidentified; the pseudomolecular ion, molecular formula, and fragmentation pattern of these compounds were included in Table 1 and classified as "unidentified." 20 peaks were observed in *B. empetrifolia*, 14 in *B. trigona*, 23 *B. microphylla*, 26 in *B. darwinii*, and 25 in *B. vulgaris*.

3.2. Quantitative analysis of phenolic compounds

Quantitative analysis was performed by external calibration. The figure of merit of this method are presented in the Supplementary Material (Table S2). The main families detected in Berberis leaves were HCADs and flavonols. All detected signals of these families (over Limit of Quantification) were interpolated in the respective calibration curves of 3-cafeoylquinic acid or quercetin-3-glucoside. The main signals observed in all chromatograms were HCADs. In particular, 3-cafeoylquinic acid was the main compound in all the leaves, with the exception of *B. trigona*, which showed a higher signal for a glucaric acid derivative (signal 8). The profile obtained for HCADs in the leaves of *B. microphylla* was similar to that observed for their fruit (see Fig. 1), showing the highest signal for 3-cafeoylquinic acid, followed by the

Table 1
Concentration of main phenolic compounds and antioxidant capacity of Berberis leaves.

Leaves	Antioxidant capacity			Concentration of main phenolic compounds		Total phenolic
	TEAC _{ABTS}	TEAC _{CUPRAC}	TEAC _{ORAC}	HCAD	Flavonols	Folin-Ciocalteu
	(eq. trolox $\mu\text{mol/g DW}$)			$(\mu\text{mol/g DW})$		(eq. GA mg/g DW)
<i>B. microphylla</i>	1108 ± 166 ^a	2319 ± 230 ^a	1949 ± 298 ^a	183 ± 19 ^a	1.9 ± 0.6 ^a	154 ± 23 ^a
<i>B. trigona</i>	165 ± 5 ^b	326 ± 29 ^b	540 ± 0 ^b	27 ± 5 ^b	1.4 ± 0.3 ^a	20 ± 0 ^b
<i>B. empetrifolia</i>	265 ± 29 ^b	477 ± 73 ^b	625 ± 2 ^b	55 ± 4 ^b	6.3 ± 0.4 ^b	36 ± 1 ^b
<i>B. vulgaris</i>	118 ± 18 ^b	284 ± 50 ^b	540 ± 34 ^b	19 ± 0 ^b	5.7 ± 0.0 ^b	21 ± 2 ^b
<i>B. darwinii</i>	625 ± 51 ^c	1481 ± 124 ^c	1480 ± 148 ^c	146 ± 9 ^a	2.6 ± 0.2 ^a	93 ± 2 ^c

Data presented as the mean ± standard deviation. Lower letters indicate significative differences ($p < 0.05$) after one-way ANOVA and Tukey comparison test. Figures of merit are presented as Supplementary Material (Table S2). TEAC_{CUPRAC}: Trolox equivalent antioxidant capacity assay by cupric-reducing antioxidant capacity. TEAC_{ABTS}: Trolox equivalent antioxidant capacity assay with 2,2,0-azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid). TEAC_{ORAC}: Trolox equivalent antioxidant capacity assay by oxygen radical absorbance capacity. GA: Gallic acid. DW: dry weight.

glucaric derivatives (Olivares-Caro et al., 2020; Ruiz et al., 2013).

The total concentrations of HCADs and flavonols in the studied leaves are presented in Table 1. The results showed that leaves of *B. microphylla* have higher concentration of these acids ($183.0 \pm 18.9 \mu\text{mol/g DW}$), followed by *B. darwinii* ($146.2 \pm 8.7 \mu\text{mol/g DW}$), in comparison with those of the other Berberis studied ($p < 0.05$), while *B. vulgaris* showed lower values of these compounds ($18.6 \pm 0.0 \mu\text{mol/g DW}$). These concentrations of HCADs, detected for the first time in the leaves of main Berberis growing in Chile, are relevant. These were very high in comparison with those described for Calafate berries (between 0.32 and $8.28 \mu\text{mol/g}$ (Ruiz et al., 2013)). The observed concentrations were also much greater than those described for other leaves used for the preparation of beverages, such as black and green tea, and other foods and coffee (El-Seedi et al., 2012). Coffee is rich in HCADs. In a recent investigation on the effect of the coffee roasting process on HCAD levels and other compounds, higher concentrations of main HCADs were detected in grains that were not roasted than in the roasted grains (75.88 – $88.87 \mu\text{mol/g}$) (Schouten et al., 2021). As can be deduced from the results, Calafate leaves surpassed more than twice their concentrations. These results exemplify the research interest in the leaves of these plants, concerning the production of functional ingredients.

In contrast, the total concentration of flavonols was less than that observed for HCADs in all the studied samples. *B. empetrifolia* showed higher flavonol levels ($6.3 \pm 0.4 \mu\text{mol/g DW}$) ($p < 0.05$) than *B. vulgaris* ($5.7 \pm 0.0 \mu\text{mol/g DW}$), *B. darwinii* ($2.6 \pm 0.2 \mu\text{mol/g DW}$), *B. microphylla* ($1.9 \pm 0.6 \mu\text{mol/g DW}$), and *B. trigona* ($1.4 \pm 0.3 \mu\text{mol/g DW}$). The findings are similar to those reported for their fruits (Ruiz, Zapata, et al., 2014). The derivatives of quercetin were the main detected flavonols in all leaves, except for *B. vulgaris*, in which isorhamnetin-3-rutinoside was the most significant flavonol. A signal annotated as kaempferol-hexoside was detected in all the Berberis species, which has not been reported previously, except in *B. microphylla* berries. The concentrations of the main individual compounds detected in all leaves are presented in the Supplementary Material (Table S3).

3.3. Antioxidant capacity

The antioxidant potential of Berberis leaves (Table 1) was studied using ABTS, CUPRAC, and ORAC methods, since it is widely accepted that, to cover all possible antioxidant mechanisms of a given sample, diverse analytical methods should be employed to assess the in vitro antioxidant properties, as combining different methods would cover different aspects of these properties, providing a comprehensive analysis (Ou et al., 2013; Ruiz, Hermosín-Gutiérrez, et al., 2010). The leaves of *B. microphylla* showed higher antioxidant capacity than those of the other Berberis leaves, as observed using the three methods, followed by *B. darwinii* and *B. empetrifolia*. *B. vulgaris* displayed only minor antioxidant capacity. These results correlated strongly with the concentration of HCADs detected in each species. There was no correlation for

flavanols. These results indicated that the HCADs are mainly responsible for the high antioxidant capacity of Berberis leaves. A good correlation between HCAD concentration and total phenolic content, determined using Folin-based testing, confirmed that these acids are the main phenolic compounds in Berberis leaves. Finally, comparing the results obtained with the ABTS method with those published for coffee grains (ABTS: 146.6 – $176.0 \mu\text{mol eq. Trolox/g}$) (Schouten et al., 2021), the levels reached by Berberis leaves were found to be very high, surpassing those of the coffee grains, *B. microphylla*, *B. darwinii*, and *B. empetrifolia*. The high antioxidant capacity of Berberis leaf species growing in Chile opens new perspectives for the utilization of these materials in producing functional ingredients for the food industry. A simple way for introduced this functional product into the diet, could be the preparation of beverages based on these promising leaves.

3.4. Identification of alkaloid in Berberis leaves

Alkaloid has been widely described in plants of Berberis genus, including in *B. microphylla* leaves (Ruiz, Zapata, et al., 2014). We evaluated the presence of these alkaloids using the same extracts and chromatographic method used for phenolic compounds analysis. The high-resolution MS was in positive mode (ESI+) and the analysis was by extraction of the respective masses and fragments of previously described alkaloids. Table 2 summarizes the molecular ions and fragments of the alkaloids found. Jatrorrhizine and berberine were identified at 30.4 min and 33.2 min, respectively. Berberine displayed a molecular ion of $[M]^+$ $[\text{C}_{20}\text{H}_{18}\text{NO}_4]^+$ 336.1221 m/z . Fragment ions were at 321 m/z (demethylated berberine), 305 m/z (other demethylation), and 292 m/z (decarboxylation $[\text{C}_{20}\text{H}_{18}\text{NO}_4 - \text{COO}]^+$). This pattern represents the common fragmentation pattern of this type of alkaloid (Sun et al., 2014). For jatrorrhizine, a molecular ion of $[M]^+$ 338.1378 and a fragmentation pattern similar to that of berberine were observed. Fragment ions were evident at 323 m/z (loss of $-\text{CH}_3$), 308 (loss of other $-\text{CH}_3$), and 280 (loss of carbonyl group). Low sensitivity was observed, which could result mainly from ionic suppression originating from the pronounced interferences in the last part of the chromatogram in which both alkaloids were eluted from the column (Ruiz, Zapata, et al., 2014). However, this result only confirmed those previously described for other authors.

3.5. Fatty acid profile in Berberis leaves

The fatty acid content in seeds of *B. buxifolia* has been previously reported (Martín-Ramos et al., 2016). However, there is no information about their content in the leaves of any Berberis species. The fatty acids detected in Berberis leaves, as FAMES, by GC-MS are presented in Table 3. The ions used for identification were at 74 and 87 m/z for saturated or monosaturated fatty acids, respectively, and at 79 and 81 m/z for di-trisaturated fatty acid (Thurnhofer & Vetter, 2005). Nine

Table 2
Alkaloids detected in Berberis leaves.

	Berberine (336.1230 m/z)			Jatrorrhizine (338.1385 m/z)		
	[M] ⁺	Error (ppm)	Ion fragments	[M] ⁺	Error (ppm)	Ion fragments
<i>B. empetrifolia</i>	336.1221	- 2.67	292 / 321	338.1378	- 2.07	308 / 323 / 280
<i>B. vulgaris</i>	336.1214	- 4.76	292	338.1369	- 4.73	308 / 280 / 323
<i>B. microphylla</i>	336.1204	- 7.74	321 / 306	338.1387	0.59	323
<i>B. darwinii</i>	336.1205	- 7.44	321	-	-	280
<i>B. trigona</i>	336.1223	- 2.08	321 / 292 / 306	338.1357	- 8.28	323

Table 3
Concentration of fatty acid in Berberis leaves.

Compound	Ions	t _R (min)	<i>B. microphylla</i> (mg/g DW)	<i>B. trigona</i> (mg/g DW)	<i>B. empetrifolia</i> (mg/g DW)	<i>B. vulgaris</i> (mg/g DW)	<i>B. darwinii</i> (mg/g DW)
Dodecanoic acid, methyl ester	74.87	17.30	0.03 ± 0.00	0.05 ± 0.00	0.03 ± 0.00	0.05 ± 0.00	-
Tetradecanoic acid, methyl ester (myristic acid)	74.87	19.97	0.06 ± 0.01	0.13 ± 0.00	0.10 ± 0.00	0.20 ± 0.02	0.08 ± 0.01
Hexadecanoic acid, methyl ester (palmitic acid)	74.87	22.46	1.25 ± 0.21	1.51 ± 0.06	1.33 ± 0.01	2.60 ± 0.19	1.65 ± 0.09
Octadecanoic acid, methyl ester (stearic acid)	74.87	24.70	0.07 ± 0.01	0.09 ± 0.01	0.07 ± 0.00	0.12 ± 0.01	0.06 ± 0.01
9-octadecenoic acid, methyl ester, (Z)- (oleic acid)	74.87	25.52	0.06 ± 0.05	0.13 ± 0.00	-	0.26 ± 0.03	-
7,10,13-hexadecatrienoic acid, methyl ester	79.81	26.05	0.06 ± 0.01	0.06 ± 0.00	0.08 ± 0.00	0.15 ± 0.02	-
9,12-octadecadienoic acid, methyl ester, (Z,Z)- (linoleic acid)	79.81	26.78	0.51 ± 0.09	0.75 ± 0.05	0.55 ± 0.01	1.16 ± 0.15	0.63 ± 0.02
9,12,15-octadecatrienoic acid, methyl ester, (Z,Z,Z)- (linolenic acid)	79.81	28.17	2.87 ± 0.48	4.65 ± 0.29	3.41 ± 0.02	9.41 ± 0.93	2.64 ± 0.05
tetracosanoic acid, methyl ester (lignoceric acid)	74.87	30.55	-	-	-	-	0.09 ± 0.01
Total			4.84 ± 0.85	7.37 ± 0.40	5.57 ± 0.03	13.96 ± 1.32	5.15 ± 0.17

t_R: retention time, DW: Dry Weight. Data presented as the mean ± standard error.

different fatty acids were identified in each sample. Their total concentration varied between 4.84 ± 0.85 mg/g DW for *B. microphylla* to 13.96 ± 1.32 mg/g DW for *B. vulgaris*, with profiles being highly conserved between species. The main fatty acids detected in all samples were linolenic acid (ALA), an essential fatty acid, which accounted for over 50% of all samples. ALA is a promoter of bioactive compounds, including phytoosterols (Phytost) and phytosterols (Phytosf), which are produced by the oxidation of ALA (Pino Ramos et al., 2019). These oxylipins are associated with cell responses to oxidative damage and might play a role as mediators of an array of pathophysiological conditions (Pino Ramos et al., 2019). It was followed by palmitic acid (approximately 25%) and linoleic acid (approximately 10%) in all samples. *B. darwinii* was the only species containing lignoceric acid, a saturated fatty acid found in wood tar, peanut seed (Dean & Sanders, 2009) and the brain. The present results are the first description of the profile of fatty acids in Calafate leaves and open new perspectives from the bioactivity point of view.

4. Conclusion

The composition of phenolic compounds was, for the first time, reported in Berberis leaves obtained from plants growing in Chile. This material has an interesting potential as functional ingredients because of the great variability of phenolic compounds in them, with high concentration of HCADs, presence of flavonols and essential fatty acids, showing a high antioxidant capacity demonstrated by three different methods. The specie that showed more potential as a functional ingredient was *B. microphylla*; additionally, *B. darwinii* and *B. trigona* also showed interesting results. Despite the higher content of essential fatty acids in *B. vulgaris*, the concentration of HCADs and the antioxidant capacity were lower than the rest. This research opens a new perspective on the utilization of these species to obtain bioactive compounds. A simple alternative for its incorporation into the diet could be the preparation of a tea beverage. Finally, the results also highlight the importance of the conservation and possible domestication of these plants.

Funding

This research was funded by Agencia Nacional de Investigación y

Desarrollo (ANID)/FONDECYT 1191276, ANID/FONDEQUIP EQM-170023, ANID/ Beca Doctorado Nacional 21171702 and ANID ACE210012.

ORCID authorship contribution statement

Daniela Nova-Baza: Methodology, Software, Validation, Formal analysis, Investigation, Writing – original draft, Visualization. **Lía Olivares-Caro:** Software, Formal analysis. **Luis Bustamante:** Conceptualization, Methodology, Software, Investigation, Data curation, Writing – review & editing, Supervision. **Andy J. Pérez:** Methodology, Investigation, Writing – review & editing, Supervision. **Carola Vergara:** Writing – review & editing. **Jorge Fuentealba:** Writing – review & editing, Supervision. **Claudia Mardones:** Conceptualization, Methodology, Investigation, Resources, Writing – review & editing, Visualization, Supervision, Project administration, Funding acquisition.

Declaration of Competing Interest

The authors declare that they have no known competing financial interests or personal relationships that could have appeared to influence the work reported in this paper.

Appendix A. Supplementary material

The following are available online at Table S1: Metabolic profile by HPLC-ESI-QTOF of Berberis leaves, Table S2: Figure of merit of the quantitative method, Table S3: Quantification of HCAs and Flavonols in Berberis leaves. Supplementary data to this article can be found online at <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2022.111642>.

References

- Abykerimova, S., Sakipova, Z., Nakonieczna, S., Koch, W., Biernasiuk, A., Grabarska, A., Malm, A., Kozhanova, K., & Kukula-Koch, W. (2020). Superior antioxidant capacity of berberis iliensis—HPLC-QTOF-MS based phytochemical studies and spectrophotometric determinations. *Antioxidants*, 9(6), 1–19. <https://doi.org/10.3390/antiox9060504>
- Ahn, Y. O., Mizutani, M., Saino, H., & Sakata, K. (2004). Furcattin hydrolase from *Viburnum furcattum* blume is a novel disaccharide-specific acuminosidase in glycosyl

- hydrolase family 1. *Journal of Biological Chemistry*, 279(22), 23405–23414. <https://doi.org/10.1074/jbc.M311379200>
- Arena, M. E., Pastur, G. M., Lencinas, M. V., Soler, R., & Bustamante, G. (2020). Changes in the leaf nutrient and pigment contents of *Berberis microphylla* G. Forst. in relation to irradiance and fertilization. *Heliyon*, 6(1), Article e03264. <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2020.e03264>
- Bhardwaj, D., & Kaushik, N. (2013). *Phytochemical and pharmacological studies in genus Berberis*, 2012, 523–542. <https://doi.org/10.1007/s11101-013-9272-x>
- Cabañas-García, E., Areche, C., Jáuregui-Rincón, J., Cruz-Sosa, F., & Balch, E. P. M. (2019). Phytochemical profiling of coryphantha macromeris (cactaceae) growing in greenhouse conditions using ultra-high-performance liquid chromatography–tandem mass spectrometry. *Molecules*, 24(4). <https://doi.org/10.3390/molecules24040705>
- Chamorro, M. F., Reiner, G., Theoduloz, C., Ladio, A., Schmeda-Hirschmann, G., Gómez-Alonso, S., & Jiménez-Aspee, F. (2019). Polyphenol composition and (bio)activity of *Berberis* species and wild strawberry from the Argentinean Patagonia. *Molecules*, 24(18), 1–24. <https://doi.org/10.3390/molecules24183331>
- Čirić, A., Prosen, H., Jelikić-Stankov, M., & Durević, P. (2012). Evaluation of matrix effect in determination of some bioflavonoids in food samples by LC-MS/MS method. *Talanta*, 99(December 2017), 780–790. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2012.07.025>
- Dean, L. L., & Sanders, T. H. (2009). Hexacosanoic acid and other very long-chain fatty acids in peanut seed oil. *Plant Genetic Resources: Characterisation and Utilisation*, 7(3), 252–256. <https://doi.org/10.1017/S1479262109339155>
- Ducruix, A., Pascard, C., Hammonniere, M., & Poisson, J. (1977). The crystal and molecular structure of mascaroside, a new bitter glycoside from coffee beans. *Acta Crystallographica Section B Structural Crystallography and Crystal Chemistry*, 33(9), 2846–2850. <https://doi.org/10.1107/s0567740877009601>
- El Sayed, M. A., Al Gendy, A. A., Hamdan, D. I., & El-Shazly, A. M. (2017). Phytoconstituents, LC-ESI-MS profile, antioxidant and antimicrobial activities of citrus X limon L. *Burni*. F. cultivar variegated pink lemon. *Journal of Pharmaceutical Sciences and Research*, 9(4), 375–391.
- El Seedi, H. R., El-Said, A. M. A., Khalifa, S. A. M., Göransson, U., Bohlin, L., Borg-Karlson, A. K., & Verpoorte, R. (2012). Biosynthesis, natural sources, dietary intake, pharmacokinetic properties, and biological activities of hydroxycinnamic acids. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 60(44), 10877–10895. <https://doi.org/10.1021/jf301807g>
- Elsadig Karar, M. G., & Kuhnert, N. (2016). UPLC-ESI-Q-TOF-MS/MS characterization of phenolics from *Crataegus monogyna* and *Crataegus laevigata* (hawthorn) leaves, fruits and their herbal derived drops (*Crataegutt Tropfen*). *Journal of Chemical Biology & Therapeutics*, 01(02), 1–23. <https://doi.org/10.4172/2572.0406.1000102>
- Fernández-Poyatos, M. D. P., Zengin, G., Salazar-Mendías, C., Ruiz-Medina, A., Sinián, K. I., & Llorent-Martínez, E. J. (2020). Study on three sarcocapsos species as potential sources of bioactive compounds: relation between phenolic content and bioactivity by multivariate analysis. *Journal of Analytical Methods in Chemistry*, 2020. <https://doi.org/10.1155/2020/8885169>
- Feussner, K., Kaefer, A., Landesfeind, M., Thurow, C., Karlovsky, P., Gatz, C., Polle, A., & Feussner, I. (2014). *Soluble phenylpropanoids are involved in the defense response of Arabidopsis against Verticillium longisporum*. 823–837. <https://doi.org/10.1111/nph.12709>
- Fiehn, O., Robertson, D., Griffin, J., van der Werf, M., Nikolau, B., Morrison, N., Sumner, L. W., Goodacre, R., Hardy, N. W., Taylor, C., Fostel, J., Kristal, B., Kaddurah-Daouk, R., Mendes, P., van Ommen, B., Lindon, J. C., & Sansone, S. A. (2007). The metabolomics standards initiative (MSI). *Metabolomics*, 3(3), 175–178. <https://doi.org/10.1007/s11306-007-0070-6>
- Landrum, L. R. (1999). Revision of *Berberis* (Berberidaceae) in Chile and adjacent southern Argentina. *Annals of the Missouri Botanical Garden*, 86(4), 793. <https://doi.org/10.2307/2666170>
- Larrazábal-Fuentes, M. J., Fernández-Galleguillos, C., Palma-Ramírez, J., Romero-Parra, J., Sepúlveda, K., Galetovic, A., González, J., Paredes, A., Bórquez, J., Simiriotis, M. J., & Echeverría, J. (2020). Chemical profiling, antioxidant, anticholinesterase, and antiprotozoal potentials of *Artemisia copa* Phil. (Asteraceae). *Frontiers in Pharmacology*, 11(December), 1–13. <https://doi.org/10.3389/fphar.2020.594174>
- Li, Z. H., Guo, H., Xu, W. B., Ge, J., Li, X., Alimu, M., & He, D. J. (2016). Rapid identification of flavonoid constituents directly from PTP1B inhibitive extract of raspberry (*Rubus idaeus* L.) leaves by HPLC-ESI-QTOF-MS-MS. *Journal of Chromatographic Science*, 54(5), 805–810. <https://doi.org/10.1093/chromsci/bmw016>
- Maas, M., Petereit, F., & Hensel, A. (2009). Caffeic acid derivatives from *Eupatorium perfoliatum* L. *Molecules*, 14(1), 36–45. <https://doi.org/10.3390/molecules14010036>
- Martícorena, C., & Rodríguez, R. (2003). *Flora de Chile Vol 2 (2)*. Universidad de Concepción.
- Martín-Ramos, P., Martín-Gil, J., Ramos-Sánchez, M. del C., Hernández-Navarro, S., & Martín-Gil, F. J. (2016). Comportamiento térmico de las semillas de calafate (*Berberis buxifolia*). *Bosque*, 37(3), 625–630. <https://doi.org/10.4067/S0717-92002016000300019>
- Mekky, R. H., Abdel-Sattar, E., Segura-Carretero, A., & Del Mar Contreras, M. (2019). Phenolic compounds from sesame cake and antioxidant activity: A new insight for agri-food residues' significance for sustainable development. *Foods*, 8(10). <https://doi.org/10.3390/foods8100432>
- Mekky, R. H., Contreras, M. del M., El-Gindi, M. R., Abdel-Monem, A. R., Abdel-Sattar, E., & Segura-Carretero, A. (2015). Profiling of phenolic and other compounds from Egyptian cultivars of chickpea (*Cicer arrietinum* L.) and antioxidant activity: a comparative study. *RSC Advances*, 5(23), 17751–17767. <https://doi.org/10.1039/C4RA13155J>
- Mykhalenko, O., Korinek, M., Ivanauskas, L., Bezruk, I., Myhal, A., Petrikaitė, V., El-Shazly, M., Lin, G.-H., Lin, C.-Y., Yen, C.-H., Chen, B.-H., Georgiyants, V., & Hwang, T.-L. (2020). Qualitative and quantitative analysis of Ukrainian iris species: A fresh look on their antioxidant content and biological activities. *Molecules*, 25(19), 4588. <https://doi.org/10.3390/molecules25194588>
- Neri-Numa, I. A., Pessóá, M. G., Arruda, H. S., Pereira, G. A., Paulino, B. N., Angolini, C. F. F., Ruiz, A. L. T. G., & Pastore, G. M. (2020). Genipap (Genipa americana L.) fruit extract as a source of antioxidant and antiproliferative iridoids. *Food Research International*, 134, Article 109252. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2020.109252>
- Nie, R., Zhang, Y., Jin, Q., Zhang, S., Wu, G., Chen, L., Zhang, H., & Wang, X. (2021). Identification and characterisation of bioactive compounds from the seed kernels and hulls of *Paeonia lactiflora* Pall by UPLC-QTOF-MS. *Food Research International*, 139(September 2020), 109916. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2020.109916>
- Olivares-Caro, L., Radjovic, C., Chau, S. Y., Nova, D., Bustamante, L., Neira, J. Y., Perez, A. J., & Mardones, C. (2020). *Berberis microphylla* G. Forst (calafate) berry extract reduces oxidative stress and lipid peroxidation of human LDL. *Antioxidants*, 9(12), 1–20. <https://doi.org/10.3390/antiox9121171>
- Ou, B., Chang, T., Huang, D., & Prior, R. L. (2013). Determination of total antioxidant capacity by oxygen radical absorbance capacity (ORAC) using fluorescein as the fluorescence probe: First action 2012.23. *Journal of AOAC International*, 96(6), 1372–1376. <https://doi.org/10.5740/jaoacint.13.175>
- Panche, A. N., Diwan, A. D., & Chandra, S. R. (2016). Flavonoids: An overview. *Journal of Nutritional Science*, 5. <https://doi.org/10.1017/jns.2016.41>
- Pino Ramos, L. L., Jiménez-Aspee, F., Theoduloz, C., Burgos-Edwards, A., Domínguez-Perles, R., Oger, C., Durand, T., Gil-Izquierdo, A., Bustamante, L., Mardones, C., Márquez, K., Contreras, D., & Schmeda-Hirschmann, G. (2019). Phenolic, oxylipin and fatty acid profiles of the Chilean hazelnut (*Gevuina avellana*): Antioxidant activity and inhibition of pro-inflammatory and metabolic syndrome-associated enzymes. *Food Chemistry*, 298(June), Article 125026. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2019.125026>
- Ruan, J., Yan, J., Zheng, D., Sun, F., Wang, J., Han, L., Zhang, Y., & Wang, T. (2019). Comprehensive chemical profiling in the ethanol extract of *Pluchea indica* aerial parts by liquid chromatography/mass spectrometry analysis of its silica gel column chromatography fractions. *Molecules*, 24(15). <https://doi.org/10.3390/molecules24152784>
- Ruiz, A., Hermosín-Gutiérrez, I., Mardones, C., Vergara, C., Herlitz, E., Vega, M., Dorau, C., Winterhalter, P., & von Baer, D. (2010). Polyphenols and antioxidant activity of calafate (*Berberis microphylla*) fruits and other native berries from Southern Chile. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 58(10), 6081–6089. <https://doi.org/10.1021/jf100173x>
- Ruiz, A., Hermosín-Gutiérrez, I., Mardones, C., Vergara, C., Herlitz, E., Vega, M., Dorau, C., Winterhalter, P., von Baer, D., Hermosín-Gutiérrez, I., Mardones, C., Vergara, C., Herlitz, E., Vega, M., Dorau, C., Winterhalter, P., & von Baer, D. (2010). Polyphenols and antioxidant activity of calafate (*Berberis microphylla*) fruits and other native berries from Southern Chile. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 58(10), 6081–6089. <https://doi.org/10.1021/jf100173x>
- Ruiz, A., Mardones, C., Vergara, C., Hermosín-Gutiérrez, I., von Baer, D., Hinrichsen, P., Rodríguez, R., Arribillaga, D., & Domínguez, E. (2013). 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, 38–45. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2013.01.059>
- Ruiz, A., Mardones, C., Vergara, C., Von Baer, D., Gómez-Alonso, S., Gómez, M. V., & Hermosín-Gutiérrez, I. (2014). Isolation and structural elucidation of anthocyanidin 3,7-β-D-glucosides and caffeoyl glucaric acids from calafate berries. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 62(29), 6918–6925. <https://doi.org/10.1021/jf5012825>
- Ruiz, A., Zapata, M., Sabando, C., Bustamante, L., von Baer, D., Vergara, C., & Mardones, C. (2014). Flavonols, alkaloids, and antioxidant capacity of edible wild *berberis* species from Patagonia. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 62(51), 12407–12417. <https://doi.org/10.1021/jf50292z>
- Sampaio-Santos, M. I., & Kaplan, M. A. C. (2001). Biosynthesis significance of iridoids in chenosystematics. *Journal of the Brazilian Chemical Society*, 12(2), 144–153. <https://doi.org/10.1590/S0103-50532001000200004>
- Schmeda-Hirschmann, G., Jiménez-Aspee, F., Theoduloz, C., & Ladio, A. (2019). Patagonian berries as native food and medicine. *Journal of Ethnopharmacology*, 241, Article 111979. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2019.111979>
- Schmidt, W. (2021). IRONMAN tunes responses to iron deficiency in concert with environmental pH. *BioRxiv, February*, 2021.02.16.431461. <https://doi.org/10.1101/2021.02.16.431461>
- Schouten, M. A., Tappi, S., Angeloni, S., Cortese, M., Caprioli, G., Vittori, S., & Romani, S. (2021). Acrylamide formation and antioxidant activity in coffee during roasting – A systematic study. *Food Chemistry*, 343, Article 128514. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2020.128514>
- Serag, A., Baky, M. H., Döll, S., & Farag, M. A. (2019). UHPLC-MS metabolome based classification of umbelliferous fruit taxa: A prospect for phyto-equivalency of its different accessions and in response to roasting. *RSC Advances*, 10(1), 76–85. <https://doi.org/10.1039/c9ra07841j>
- Steingass, C. B., Glock, M. P., Schweiggert, R. M., & Carle, R. (2015). Studies into the phenolic patterns of different tissues of pineapple (*Ananas comosus* [L.] Merr.) infrecrutescence by HPLC-DAD-ESI-MS n and GC-MS analysis. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 407(21), 6463–6479. <https://doi.org/10.1007/s00216-015-8811-2>
- Steingass, C. B., Glock, M. P., Lieb, V. M., & Carle, R. (2017). Light-induced alterations of pineapple (*Ananas comosus* [L.] Merr.) juice volatiles during accelerated ageing and

Supplementary Material

Metabolic profile and antioxidant capacity of five Berberis leaves species: A comprehensive study to determine their potential as natural food or ingredient

Daniela Nova-Baza^a, Lía Olivares-Caro^a, Luis Bustamante^a, Andy J. Pérez^a and Claudia Mardones^{a*}

^aDepartamento de Análisis Instrumental, Facultad de Farmacia, Universidad de Concepción, Concepción, Chile; daninovabaza@gmail.com (D.N.); liaolivares@udec.cl (L.O.); aperezd@udec.cl (A.P.); lbust85@gmail.com (L.B.); cmardone@udec.cl (C.M.)

*Correspondence: cmardone@udec.cl (C.M.); Tel.: +56983616340 (C.M)

Table S1. Metabolic profile by HPLC-ESI-QTOF of Berberis leaves

N ^o peak	t _r ^a	λ (nm) ^b	Molecular Ion formula	[M-H] ⁻	Fragment ions	error (ppm)	m/z ^c	Compound	Detected in leaf *	Reference
1	11.1	---	[C ₁₄ H ₁₇ O ₉] ⁻	329.0878	167.0350; 108.0217; 152.011	0.1	10.6	vanillic acid hexoside	A, B, C, D, E	(Chamorro et al., 2019)
2	11.1	---	[C ₁₄ H ₁₉ O ₈] ⁻	315.1083	153.0193	0.8	8.1	dihydroxybenzoic acid hexoside	A, B, C, D, E	(Cabañas-García, Areche, Jáuregui-Rincón, Cruz-Sosa, & Balch, 2019; Elsadig Karar & Kuhnert, 2016)
3	11.1	---	[C ₁₅ H ₁₉ O ₁₀] ⁻	359.0992	153.0557; 197.0455; 179.0350	-2.4	5.8	syringic acid hexoside	A, B, D, E	(Elsadig Karar & Kuhnert, 2016)
4	11.2	327	[C ₁₅ H ₁₅ O ₁₁] ⁻	371.0626	209.0303; 191.0197; 135.0452; 179.0350	-1.8	1.3	3- or 4-trans-caffeoyl-glucaric acid	A, B, C, D, E	(Olivares-Caro et al., 2020; Ruiz, Mardones, et al., 2014)
5	11.8	290;320	[C ₁₃ H ₁₅ O ₉] ⁻	315.0718	153.0193; 109.0295	1	2.1	protocatechuic acid hexoside	A, B, C, D, E	(Cabañas-García et al., 2019; Elsadig Karar & Kuhnert, 2016)
6	11.9	249;330	[C ₁₅ H ₁₇ O ₁₂] ⁻	389.074	147.0244; 191.0197; 197.0455	-3.7	8.1	unidentified	A, B, C, D, E	
7	12.1	327	[C ₁₅ H ₁₅ O ₁₁] ⁻	371.0615	209.0303; 191.0197; 135.0452; 179.0350	1.3	3.5	3- or 4-trans-caffeoyl-glucaric acid	A, B, C, D, E	(Olivares-Caro et al., 2020; Ruiz, Mardones, et al., 2014)
8	12.6	303	[C ₁₇ H ₂₃ O ₁₁] ⁻	403.1242	223.0612; 193.0142; 208.0377; 123.0088	0.9	2.6	gardenoside	A, B, C, D, E	(Lee, Hong, & Whang, 2014; Neri-Numa et al., 2020)
9	12.6	303	[C ₂₄ H ₂₃ O ₁₅] ⁻	551.103	209.0303; 191.0197; 133.434	2.2	14.7	unidentified	C	
10	12.7	328	[C ₁₅ H ₁₅ O ₁₁] ⁻	371.062	209.0303; 191.0197; 135.0452; 179.0350	-0.1	0.7	2- or 5-trans-caffeoyl-glucaric acid	A, B, C, D, E	(Olivares-Caro et al., 2020; Ruiz, Mardones, et al., 2014)
11	13	---	[C ₁₅ H ₁₉ O ₁₀] ⁻	359.0987	153.0193	-1.1	9.5	syringic acid hexoside	B, C, E	(Elsadig Karar & Kuhnert, 2016)
12	13	---	[C ₁₄ H ₁₅ O ₈] ⁻	311.0781	189.0557; 207.0663; 161.0608	-2.9	17.5	unidentified	A, B, C, D, E	
13	13.3	326	[C ₁₆ H ₁₇ O ₉] ⁻	353.0879	191.0561; 135.0452; 173.0455	-0.3	2.7	5-caffeoylquinic acid ¹	A, B, C, D, E	(Olivares-Caro et al., 2020; Ruiz et al., 2013)
14	13.7	285	[C ₁₅ H ₁₉ O ₁₀] ⁻	359.098	197.0455; 153.0557	0.9	3	syringic acid hexoside	A, B, C, D, E	(Elsadig Karar & Kuhnert, 2016)
15	13.7	287	[C ₁₅ H ₁₅ O ₁₁] ⁻	371.064	209.0303; 191.0197; 135.0452	-5.5	13.7	2- or 5-trans-caffeoyl-glucaric acid	A, B, C, D, E	(Olivares-Caro et al., 2020; Ruiz, Mardones, et al., 2014)
16	13.7	285	[C ₁₅ H ₂₁ O ₉] ⁻	345.1191	179.0502; 179.0562; 137.0608	0	8	aucubin	A, C	(Sampaio-Santos & Kaplan, 2001)
17	13.7	287	[C ₁₈ H ₁₉ O ₁₂] ⁻	427.0866	359.0977; 197.0455	3.5	16.5	unidentified	A, B	
18	13.9	284	[C ₁₄ H ₁₈ O ₉] ⁻	329.0889	167.0350; 239.0561; 109.0295	-3.5	8.4	vanillic acid hexoside	A, B, C, D, E	(Chamorro et al., 2019)
19	14.2	281	[C ₂₁ H ₂₃ O ₁₄] ⁻	499.1087	337.0565; 203.0409; 298.0483	1.3	4.9	unidentified	A, B, C, D, E	
20	14.4	282	[C ₁₃ H ₁₅ O ₈] ⁻	299.0769	137.0244; 109.0295; 119.0139; 221.0455	1.1	12.4	Hydroxybenzoate hexoside	A, B, C, D, E	(Mekky et al., 2015)
21	14.6	294	[C ₁₅ H ₁₅ O ₉] ⁻	339.0735	177.0193; 133.0295	-4.1	17.1	esculin	A, B, C, D, E	(Serag, Baky, Döll, & Farag, 2019)
22	14.6	327	[C ₁₆ H ₁₇ O ₁₁] ⁻	385.0765	191.0197; 223.0459;	3	1.1	feruloyl galactaric acid	A, B, C, D, E	(Olivares-Caro et al., 2020)

					135.0452; 179.0350					
23	14. 7	326	[C ₂₁ H ₂₁ O ₁₂] ⁻	465.104 2	303.0510; 285.0405; 285.0463	0.7	4.8	Plantagoside	A, E	(Nie et al., 2021)
24	14. 9	328	[C ₁₅ H ₁₃ O ₁₀] ⁻	353.051	191.0197; 135.0452; 179.0350; 161.0244	1.3	10.1	caffeoyl(iso)citric acid	A, B, C, D, E	(Christof B. Steingass, Glock, Schweiggert, & Carle, 2015)
25	14. 9	330	[C ₁₇ H ₁₁ O ₁₀] ⁻	375.034 6	201.0193	4.1	1.9	unidentified	B, C	
26	15. 4	324	[C ₁₆ H ₁₇ O ₁₁] ⁻	385.075 7	191.0197; 223.0459; 179.0350	5	13.8	feruloylgalactaric acid	A, B, C, D, E	(Olivares-Caro et al., 2020)
27	15. 4	324	[C ₁₅ H ₁₇ O ₉] ⁻	341.086	179.0350; 161.0244; 135.0452; 117.0346	5.2	7.8	caffeoyl-beta-D-glucose	A, B, C, D, E	(Christof B. Steingass et al., 2015)
28	15. 9	249;320	[C ₁₅ H ₁₉ O ₉] ⁻	343.104	181.0506; 137.0608;	-1.7	18.8	pleoside	A,B,C D, E	(Larrazábal-Fuentes et al., 2020)
29	16	326	[C ₂₇ H ₂₉ O ₁₅] ⁻	593.149 8	383.0772; 413.0878; 413.0937; 161.0244	2.3	9.5	unidentified	B	
30	16. 1	327	[C ₁₆ H ₁₇ O ₉] ⁻	353.086 2	191.0561; 161.0244;	4.5	3.9	3-caffeoylquinic acid ¹	A, B, C, D, E	(Olivares-Caro et al., 2020; Ruiz et al., 2013)
31	16. 3	315	[C ₁₆ H ₁₇ O ₈] ⁻	337.091 9	163.0401;119.0502 ; 191.0561; 173.0455	3.4	9.8	coumaroylquinic acid	B, C	(Christof B. Steingass et al., 2015)
32	16. 4	325	[C ₁₆ H ₁₇ O ₉] ⁻	353.085 4	191.0561; 179.0350; 173.0397; 161.0244; 191.0197; 127.0401; 147.0299	6.8	6.9	caffeoylquinic acid	B, C, D	(Olivares-Caro et al., 2020; Ruiz et al., 2013)
33	16. 4	325	[C ₁₄ H ₁₃ O ₈] ⁻	309.060 2	161.0244; 133.0295; 179.0502	-8.2	9.5	unidentified	A, B, C, D; E	
34	16. 5	328	[C ₁₅ H ₁₃ O ₁₀] ⁻	353.050 2	191.0197; 135.0452; 147.0299; 129.0193	3.5	5.7	caffeoylisocitric acid	A, C	(Christof B. Steingass et al., 2015)
35	16. 7	327	[C ₁₈ H ₁₅ O ₈] ⁻	359.075 8	243.0366; 135.0452; 179.0350; 109.0295	3.9	19.6	rosmarinic acid	A, C, D, E	(Sun, Tao, & Zhang, 2019)
36	16. 7	327	[C ₁₆ H ₁₇ O ₁₁] ⁻	385.077 4	191.0197; 223.0459	0.5	6	feruloylgalactaric acid	A, B, C, D, E	(Olivares-Caro et al., 2020)
37	16. 9	327	[C ₁₆ H ₁₇ O ₁₁] ⁻	385.077 5	191.0197; 223.0459; 135.0452; 179.0350	0.2	2.4	feruloylgalactaric acid	A, B, C, D, E	(Olivares-Caro et al., 2020)
38	17. 1	---	[C ₂₄ H ₂₅ O ₁₆] ⁻	569.112 1	197.0455; 129.0193; 371.0620	4.7	13.8	unidentified	C	
39	17. 4	330	[C ₁₅ H ₁₃ O ₁₀] ⁻	353.050 5	191.0197; 161.0244; 135.0452; 179.0350	2.6	2.1	caffeoyl(iso)citric acid	A, B, C, D, E	(Christof B. Steingass et al., 2015)
40	17. 4	330	[C ₁₇ H ₁₁ O ₁₀] ⁻	375.032	201.0346	10	8.9	unidentified	B, C	
41	17. 5	327	[C ₁₇ H ₁₉ O ₉] ⁻	367.101 9	193.0506; 173.0455	4.2	8.9	feruloylquinic acid	B, C	(Ruan et al., 2019)
42	17. 5	329	[C ₁₆ H ₁₇ O ₁₁] ⁻	385.076 1	223.0459; 191.0197; 135.0452; 179.0350	4	6.7	feruloylgalactaric acid	A, B, C, D, E	(Olivares-Caro et al., 2020)
43	18	280;330	[C ₁₈ H ₁₅ O ₈] ⁻	359.074 9	243.0366; 135.0452	6.4	10.8	rosmarinic acid	A, B, C, D, E	(Sun et al., 2019)

44	18.1	-	[C ₁₇ H ₂₁ O ₁₀] ⁻	385.1126	175.0037; 223.0618; 265.0718	3.7	6.9	sinapic acid hexoside	A, B, D	(Christof B. Steingass et al., 2015)
45	18.3	324	[C ₂₄ H ₂₁ O ₁₄] ⁻	533.0926	209.0303; 371.0620; 191.0197; 147.0299; 179.0350; 135.0452	2	4.7	dicafeoylglucari c acid	A, C, E	(Maas, Petereit, & Hensel, 2009; Ruiz et al., 2013)
46	18.4	325	[C ₁₈ H ₂₅ O ₁₀] ⁻	401.1466	269.1031	-3.3	5.6	benzyl alcohol-hexose-pentose	A, C, D, E	(Elsadig Karar & Kuhnert, 2016)
47	18.4	325	[C ₁₈ H ₂₅ O ₁₀ +HCOO] ⁻	447.1521	401.1453; 269.1031; 161.0455; 113.0244; 191.0561	-2.9	18	benzyl alcohol-hexose-pentose + HCOOH	A, C, D, E	(Elsadig Karar & Kuhnert, 2016)
48	18.3	280;330	[C ₁₈ H ₂₇ O ₉] ⁻	387.1663	207.1027; 163.1128	-0.7	14.3	tuberonic acid glucoside	D	(Mekky et al., 2015)
49	18.4	285	[C ₂₄ H ₂₅ O ₁₆] ⁻	569.113	197.0455; 129.0193; 371.0620	3.1	15.2	unidentified	C, E	
50	18.4	325	[C ₂₀ H ₃₁ O ₁₀] ⁻	431.1936	179.0561; 385.1868	-2.8	17.4	unidentified	A, B, C, D, E	
51	19.1	-	[C ₁₆ H ₂₁ O ₈] ⁻	341.1234	179.0714; 121.0295; 136.0530	2.2	6.6	coniferin	A	(Feussner et al., 2014)
52	19.1	---	[C ₂₇ H ₂₉ O ₉] ⁻	433.2014	387.2024; 161.0455	1.5	11.2	propanedioic acid, [5-[[2-[(6-deoxyα-L-galactopyranosyl)oxy] cyclohexyl]oxy]-Pentyl]	B	(Cabañas-García et al., 2019)
53	19.1	310	[C ₁₆ H ₁₇ O ₉] ⁻	353.0886	191.0561; 161.0244			caffeoylquinic acid	A, B, C, D, E	(Olivares-Caro et al., 2020; Ruiz et al., 2013)
54	19.5	329	[C ₁₆ H ₁₇ O ₁₁] ⁻	385.077	223.0459; 191.0197; 135.0452	1.7	13.6	feruloyl galactaric acid	A, B, C, D, E	(Olivares-Caro et al., 2020)
55	19.5	329	[C ₂₄ H ₂₃ O ₁₃] ⁻	551.1034	389.0667; 191.0197	1.6	6.2	unidentified	A, C, E	
56	19.5	-	[C ₂₀ H ₃₁ O ₁₀] ⁻	431.1924	385.1868; 223.1340; 153.0921; 161.0455	-0.4	11.6	unidentified	A, B, C, D, E	
57	19.7	328	[C ₁₅ H ₁₃ O ₁₀] ⁻	353.0527	191.0197; 161.0244; 135.0452	1.4	22.6	caffeoyl(iso)citric acid	A, B, C, D, E	(Christof B. Steingass et al., 2015)
58	20.1	285	[C ₁₆ H ₂₁ O ₈] ⁻	341.1239	179.0714; 121.0295	0.7	3.3	coniferin	A, C	(Feussner et al., 2014)
59	20.1	285	[C ₂₁ H ₂₁ O ₁₂] ⁻	465.1031	285.0405; 285.0463; 303.0510	1.5	12.5	plantagoside	A	(Nie et al., 2021)
60	20.2	326	[C ₂₄ H ₂₁ O ₁₄] ⁻	533.0933	209.0303; 191.0197; 179.0350	0.6	5.2	dicafeoylglucari c acid	A, C, E	(Maas et al., 2009; Ruiz et al., 2013)
61	20.2	---	[C ₂₇ H ₂₉ O ₉] ⁻	433.2054	179.0561	8.9	19.1	propanedioic acid, [5-[[2-[(6-deoxyα-L-galactopyranosyl)oxy] cyclohexyl]oxy]-Pentyl]	B, E	(Cabañas-García et al., 2019)
62	20.4	327	[C ₁₆ H ₁₇ O ₈] ⁻	337.0923	191.0561; 173.0455; 163.0401; 135.0452	1.7	17.6	coumaroylquinic acid	A, B, C, D, E	(Christof B. Steingass et al., 2015)
63	20.4	327	[C ₁₅ H ₁₃ O ₁₀] ⁻	353.0518	191.0197; 135.0452; 161.0244; 179.0350;	-1.2	4.9	caffeoyl(iso)citric acid	A, B, D, E	(Christof B. Steingass et al., 2015)
64	20.7	330	[C ₁₅ H ₁₃ O ₁₀] ⁻	353.0524	191.0197; 135.0452; 161.0244;	-2.7	9	caffeoyl(iso)citric acid	A, B, C, D, E	(Christof B. Steingass et al., 2015)

65	20. 9	---	[C ₂₀ H ₃₃ O ₁₀] ⁻	433.205 6	387.2024; 161.0455	5.4	3.1	propanedioic acid, [5-[[2-[(6-deoxy- α -L-galactopyranosyl)oxy]cyclohexyl]oxy]-Pentyl]	B, C, D, E	(Cabañas-García et al., 2019)
66	21. 2	326	[C ₂₆ H ₃₅ O ₁₁] ⁻	523.219 5	361.1657; 346.1422	-1.9	3.6	mascaroside	A, B, C, D, E	(Ducruix, Pascard, Hammonniere, & Poisson, 1977)
67	21. 4	326	[C ₁₅ H ₁₃ O ₉] ⁻	337.056 9	145.0295	-4.2	4.9	Coumaroyl (iso)citric acid	A, B, C, D, E	(Christof B. Steingass et al., 2015; Christof Björn Steingass, Glock, Lieb, & Carle, 2017)
68	21. 4	---	[C ₁₆ H ₁₅ O ₁₁] ⁻	383.061 9	337.0565; 163.0401; 347.0405	0.1	6.8	Coumaroyl (iso)citric acid + HCOOH	B, C	(Christof B. Steingass et al., 2015; Christof Björn Steingass et al., 2017)
69	21. 4	327	[C ₁₆ H ₁₇ O ₁₁] ⁻	385.079 5	191.0197; 223.0459; 179.0350	-4.9	5	feruloylgalactaric acid	A, B, C, D, E	(Olivares-Caro et al., 2020)
70	21. 6	327	[C ₁₇ H ₁₉ O ₉] ⁻	367.102 1	173.0455	3.6	11.4	feruloylquinic acid	B	(Ruan et al., 2019)
71	21. 6	---	[C ₁₆ H ₁₅ O ₁₀] ⁻	367.066 4	161.0244; 133.0310	1.7	20.7	feruloyl(iso)citric acid	A, D, E	(Christof Björn Steingass et al., 2017)
72	21. 6	---	[C ₂₀ H ₃₁ O ₁₀] ⁻	431.194 3	161.0244; 133.0294			unidentified	A, D	
73	21. 9	326	[C ₁₇ H ₁₉ O ₉] ⁻	367.105 6	161.0244; 133.0290	-5.4	18.6	feruloylquinic acid	A, B, C, D, E	(Ruan et al., 2019)
74	22. 1	326	[C ₁₃ H ₃₇ O ₁₅] ⁻	433.208 5	161.0244; 133.0292	-1.4	18.1	propanedioic acid, [5-[[2-[(6-deoxy- α -L-galactopyranosyl)oxy]cyclohexyl]oxy]-Pentyl]	A, B, E	(Cabañas-García et al., 2019)
75	22. 1	323	[C ₁₆ H ₁₇ O ₁₀] ⁻	369.083 7	161.0244; 133.0284	-2.8	17	unidentified	E	
76	22. 2	249	[C ₁₇ H ₁₉ O ₁₁] ⁻	399.093 3	161.0244; 179.0350; 191.0562	-1.2	14.9	sinapic acid glucuronide	A, D, E	(Mekky, Abdel-Sattar, Segura-Carretero, & Del Mar Contreras, 2019)
77	22. 4	280;33 0	[C ₂₁ H ₂₁ O ₁₂] ⁻	465.106 7	303.051	-6.1	17.1	plantagoside	E	(Nie et al., 2021)
78	22. 5	351	[C ₂₇ H ₂₉ O ₁₆] ⁻	609.146 8	301.0354; 151.0037; 178.9986	-1.1	3.1	quercetin-3-rutinoside ¹	A, B, C, D, E	(Ćirić, Prosen, Jelikić-Stankov, & Durević, 2012; Olivares-Caro et al., 2020)
79	22. 6	290;32 0	[C ₂₇ H ₂₉ O ₁₅] ⁻	515.121 7	191.0561; 179.0350	-4.2	9.3	1,3-dicafeoylquinic acid ¹	A, C, E	(Olivares-Caro et al., 2020; Ruiz et al., 2013)
80	22. 7	326	[C ₂₄ H ₂₁ O ₁₄] ⁻	533.095 1	209.0303; 371.0620; 191.0197; 135.0452	-2.8	10.2	dicafeoylglucuronic acid	A, C, E	(Maas et al., 2009; Ruiz et al., 2013)
81	22. 9	327	[C ₂₅ H ₂₃ O ₁₂] ⁻	515.117 1	191.0561; 353.0878; 179.0350; 135.0452	4.6	4	dicafeoylquinic acid	A, C, E	(Olivares-Caro et al., 2020; Ruiz et al., 2013)
82	22. 9	249;35 2	[C ₂₃ H ₃₇ O ₁₄] ⁻	537.219 8	491.2134; 323.0984; 161.0455; 331.0882	-1.7	10	unidentified	D	
83	22. 9	249;35 2	[C ₃₇ H ₂₉ O ₁₃] ⁻	677.136	302.0279 288	-8.7	5.2	unidentified	D	
84	22. 9	249;35 2	[C ₂₂ H ₃₅ O ₁₂] ⁻	491.214 2	331.0882	-1.5	13	unidentified	D	
85	23 23	326	[C ₂₄ H ₂₁ O ₁₄] ⁻	533.093 9	209.0303; 371.0620	-0.4	12.4	dicafeoylglucuronic acid	C	(Maas et al., 2009; Ruiz et al., 2013)
86	23. 1	-	[C ₂₇ H ₂₉ O ₁₅] ⁻	593.153 1	285.0405;	-3.2	6.4	kaempferol-rutinoside	E	(Chamorro et al., 2019)

87	23.1	290	[C ₁₈ H ₃₁ O ₁₂]	439.183 1	393.1766; 149.0455; 179.0561	-2.3	19.2	unidentified	A, C, D, E	
88	23.4	330	[C ₁₅ H ₁₃ O ₁₀]	515.083	191.0197; 353.0514; 353.0455; 161.0244; 179.0350	-2.4	4.6	Dicaffeoyl (iso)citric acid	A, B, C, D, E	
89	23.4	330	[C ₁₇ H ₁₉ O ₉]	367.103	135.0452; 179.0350; 161.0244; 191.0561; 149.0608	0.3	5.6	feruloylquinic acid	A, B, D, E	(Ruan et al., 2019)
90	23.4	249;352	[C ₁₆ H ₄₁ O ₁₉]	537.221	331.0882; 289.0776; 161.0455;	7	16.8	unidentified	D	
91	23.5	330	[C ₂₁ H ₁₉ O ₁₀]	431.098 5	311.0561	-0.3	16.1	apigenin- hexoside	B, E	(Elsadig Karar & Kuhnert, 2016)
92	23.5	327	[C ₁₆ H ₁₇ O ₈]	337.094 8	191.0561; 191.0502	-5.8	7.3	coumaroylquinic acid	A, D, E	(Christof Björn Steingass et al., 2017)
93	23.5	330	[C ₁₇ H ₁₁ O ₁₀]	375.034 4	179.035	3.6	18.2	unidentified	B, C	
94	23.5	---	[C ₁₇ H ₂₉ O ₁₀]	393.178	150.0686	-3.6	9.8	unidentified	A, D	
95	23.6	326	[C ₁₅ H ₁₃ O ₉]	337.056 9	145.0295	-4.2	4.9	Coumaroyl (iso)citric acid	A, B, C, D, E	(Christof B. Steingass et al., 2015; Christof Björn Steingass et al., 2017)
96	23.7	329	[C ₁₇ H ₁₁ O ₁₀]	375.035 2	133.0295	1.6	19.1	unidentified	D	
97	23.8	327	[C ₂₁ H ₁₉ O ₁₀]	431.101	311.0561	-6.2	7.2	apigenin- hexoside	B, E	(Elsadig Karar & Kuhnert, 2016)
98	23.8	324	[C ₂₇ H ₃₅ O ₁₃]	567.207	359.15	2.3	10	unidentified	B, C, D, E	
99	23.9	329	[C ₂₄ H ₂₁ O ₁₄]	533.095 5	209.0303; 371.0620; 191.0197; 147.0299; 179.0350	-3.4	2.7	dicaffeoylglucari c acid	C, E	(Maas et al., 2009; Ruiz et al., 2013)
100	24	---	[C ₂₆ H ₃₃ O ₁₁]	521.202 5	359.15	0.6	16.9	isolariiresinol hexoside	B	(Ruan et al., 2019)
101	24.5	---	[C ₁₆ H ₁₅ O ₈]	335.076 9	161.0244; 135.0452; 179.0350	1	3.1	caffeoylshikimic acid	A, B, C, D, E	(Elsadig Karar & Kuhnert, 2016)
102	24.6	350	[C ₂₁ H ₁₉ O ₁₂]	463.088 3	271.0248; 301.0354; 255.0299	-0.2	5.9	quercetin-3-D- galactoside ¹	A, B, C, D, E	(Chamorro et al., 2019; Olivares-Caro et al., 2020; Ruiz, Zapata, et al., 2014)
103	24.8	355	[C ₂₀ H ₃₃ O ₁₀]	433.208 4	387.2024; 161.0455	1.1	5.3	propanedioic acid, [5-[[2-[(6- deoxyα-L- galactopyranosyl) oxy] cyclohexyl] oxy]-Pentyl]	D	(Cabañas-García et al., 2019)
104	24.9	350	[C ₂₁ H ₁₉ O ₁₂]	463.088 1	271.0248; 301.0354; 255.0299	0.1	5.9	quercetin-3- glucoside	A, B, C, D, E	(Chamorro et al., 2019; Olivares-Caro et al., 2020; Ruiz, Zapata, et al., 2014)
105	25	---	[C ₂₁ H ₁₉ O ₁₁]	447.093 1	285.0405	0.4	20	kaempferol- hexoside	A, B, C, D, E	(Elsadig Karar & Kuhnert, 2016)
106	25.1	352	[C ₂₄ H ₁₉ O ₁₄]	531.075 6	463.0882; 301.0354; 271.0248	4.6	16.4	unidentified	D	
107	25.2	---	[C ₃₃ H ₂₇ O ₁₃]	631.146 4	367.0823; 451.1035; 219.0299	-1.1	13.9	unidentified	E	
108	25.4	352	[C ₂₇ H ₂₉ O ₁₅]	593.151 2	285.0405; 257.0455	0.1	13.1	kaempferol- rutoside	A, B, D, E	(Chamorro et al., 2019)

109	25. 5	---	[C ₂₀ H ₃₅ O ₉]	419.229 4	373.2232	-1.8	9.7	unidentified	D	
110	25. 7	328	[C ₂₁ H ₂₁ O ₁₄]	533.095 2	209.0303; 371.0620; 191.0197; 147.0299; 135.0452	-2.8	3.6	dicaFFEoylglucari c acid	C, E	(Maas et al., 2009; Ruiz et al., 2013)
111	25. 7	280	[C ₂₁ H ₂₇ O ₁₄]	539.141 1	197.0397; 197.0455; 341.0819; 341.0878; 239.0561	-0.9	6.7	unidentified	B, E	
112	25. 8	326	[C ₂₈ H ₃₁ O ₁₆]	623.161 5	315.0510; 300.0276; 255.0299;175.0248 ; 227.0350	0.4	17	isorhamnetin- rutinoside	A, C, D	(Elsadig Karar & Kuhnert, 2016; Olivares-Caro et al., 2020)
113	25. 8	330	[C ₂₅ H ₂₃ O ₁₄]	547.107 4	223.0459; 385.0776; 191.0197; 353.0514	3.6	18.1	unidentified	E	
114	25. 9	283	[C ₃₃ H ₂₇ O ₁₃]	631.146 1	341.0667; 451.1035; 367.0823; 477.1191; 219.0299	0.6	16.4	unidentified	E	
115	26	289;32 6	[C ₁₆ H ₁₅ O ₁₀]	367.066 4	161.0244; 133.0310	2	2.9	feruloyl(iso)citric acid	A, D, E	(Christof Bjöm Steingass et al., 2017)
116	26. 1	249	[C ₂₅ H ₂₃ O ₁₀]	483.130 1	161.0244; 133.0294	-1	3.7	unidentified	E	
117	26. 3	249	[C ₂₅ H ₂₃ O ₁₀]	483.130 2	161.0244; 133.0290	-1.2	12.4 9	unidentified	E	
118	26. 3	281	[C ₃₃ H ₂₇ O ₁₃]	631.145 5	161.0244; 133.0292	0.3	8.2	unidentified	E	
119	26. 5	280;33 0	[C ₂₇ H ₃₁ O ₁₄]	577.156 5	161.0244; 133.0284	0.3	14.1	apigenin- rutinoside	E	(Elsadig Karar & Kuhnert, 2016)
120	26. 6	285;33 0	[C ₂₁ H ₂₁ O ₁₃]	549.089 6	301.0295; 301.0354; 271.0248	-1.8	10.4	quercetin-3- malonyl galactoside	A, E	(Olivares-Caro et al., 2020; Ruiz, Zapata, et al., 2014)
121	26. 6	330	[C ₂₃ H ₂₁ O ₁₃]	505.097 2	191.0561	3	15.1	unidentified	A, E	
122	26. 9	---	[C ₂₀ H ₃₅ O ₉]	419.229 7	373.2232	-2.5	5.5	unidentified	B, C, D	
123	26. 9	284;33 0	[C ₁₇ H ₁₃ O ₈]	313.070 2	267.0663	5	18.1	irisolidone	A, C	(Mykhailenko et al., 2020)
124	26. 9	---	[C ₁₉ H ₂₅ O ₁₀]	413.143 7	269.1031; 311.1136; 351.	4	3	unidentified	A	
125	26. 9	340	[C ₂₃ H ₂₁ O ₁₃]	505.096 6	301.0201	4.4	5.3	unidentified	A, E	
126	26. 9	---	[C ₂₈ H ₃₅ O ₁₃]	579.205	402.132	5.7	18.6	syringaresinol hexoside	A, B, E	(Christof B. Steingass et al., 2015)
127	26. 9	285	[C ₃₃ H ₂₇ O ₁₃]	631.146 6	341.0667; 451.1035; 367.0823; 477.1191; 219.0299	-1.4	18.6	unidentified	E	
128	27. 1	---	[C ₂₁ H ₂₉ O ₁₂]	473.166 1	427.1610; 293.0878	0.8	13.7	furcadin + HCOOH	C	(Ahn, Mizutani, Saino, & Sakata, 2004)
129	27. 1	---	[C ₂₀ H ₂₇ O ₁₀]	427.161 3	293.0819	-0.8	15.5	furcadin	C	(Ahn et al., 2004)
130	27. 2	340	[C ₁₆ H ₁₅ O ₁₀]	367.065 2	161.0244; 133.0310	5	2.5	feruloyl(iso)citric acid	A, D, E	(Christof Bjöm Steingass et al., 2017)
131	27. 3	349	[C ₂₁ H ₂₁ O ₁₃]	549.089 6	161.0244; 133.0294	-0.8	7.4	quercetin- malonylglucoside	A, E	(Olivares-Caro et al., 2020; Ruiz, Zapata, et al., 2014)
132	27. 3	290	[C ₂₀ H ₃₁ O ₉]	415.196	161.0244; 133.0290	3.2	13.7	unidentified	C	

133	27.4	---	[C ₂₁ H ₁₉ O ₁₁] ⁻	447.093	161.0244; 133.0292	-1.1	8.2	kaempferol-hexoside	A, B, C, D, E	(Elsadig Karar & Kuhnert, 2016)
134	27.5	280	[C ₃₃ H ₂₇ O ₁₃] ⁻	631.147 6	161.0244; 133.0284	-3	18.2	unidentified	E	
135	27.6	---	[C ₂₄ H ₁₉ O ₉] ⁻	451.102 8	341.0667	1.5	17.5	cinchonain 1a	D	(Elsadig Karar & Kuhnert, 2016)
136	27.8	340	[C ₂₂ H ₂₁ O ₁₂] ⁻	477.101 7	243.0299; 271.0248	4.6	9.1	isorhamnetin-3-glucoside	A, C, D	(Chamorro et al., 2019; Elsadig Karar & Kuhnert, 2016; Olivares-Caro et al., 2020)
137	27.8	---	[C ₁₆ H ₁₅ O ₁₀] ⁻	367.065 1	161.0244; 133.0310	4.7	17.8	feruloyl(iso)citric acid	A, E	(Christof Bjöm Steingass et al., 2017)
138	28.1	249	[C ₂₀ H ₃₁ O ₉] ⁻	415.198 1	161.0244; 133.0294	-1.7	7.9	unidentified	C, E	
139	28.2	340	[C ₂₂ H ₂₁ O ₁₂] ⁻	477.102 1	161.0244; 133.0290	3.8	12.2	isorhamnetin-hexoside	A, C, D	(Chamorro et al., 2019; Elsadig Karar & Kuhnert, 2016; Olivares-Caro et al., 2020)
140	28.2	---	[C ₂₁ H ₁₉ O ₁₁] ⁻	447.092 9	161.0244; 133.0292	0.9	16.3	kaempferol-hexoside	A, B, D, E	(Elsadig Karar & Kuhnert, 2016)
141	28.2	---	[C ₁₇ H ₂₇ O ₉] ⁻	375.165 6	161.0244; 133.0284	1.2	3	unidentified	D	
142	28.6	327	[C ₂₅ H ₂₃ O ₁₄] ⁻	547.109 9	223.0459; 191.0197; 385.0776; 179.0350; 353.0514	-1.1	11.1	unidentified	E	
143	28.8	326	[C ₂₅ H ₂₃ O ₁₂] ⁻	515.118	353.0878; 173.0455; 179.0350; 191.0452	2.8	9.1	1,5-dicaffeoylquinic ¹	A, E	(Olivares-Caro et al., 2020; Ruiz et al., 2013)
144	28.8	327	[C ₂₄ H ₂₅ O ₁₄] ⁻	537.098 9	375.0663; 201.0193; 173.0397	8.7	5.4	limocitrol-O-glucoside	A, E	(El-Sayed, Al-Gendy, Hamdan, & El-Shazly, 2017)
145	28.9	345	[C ₂₁ H ₁₉ O ₁₁] ⁻	447.093 1	271.0248; 301.0354; 255.0299; 151.0037	0.4	12.3	quercetin-3-rhamnoside ¹	A, D, E	(Ćirić et al., 2012)
146	28.9	345	[C ₃₁ H ₁₅ O ₈] ⁻	515.081 1	301.0354; 151.0037	-7.4	14.2	quercetin-3-rhamnoside + HCOONa	D	(Ćirić et al., 2012)
147	29	327	[C ₂₃ H ₂₁ O ₁₃] ⁻	505.096 4	271.0248; 301.0354; 255.0299	4.6	3.5	unidentified	A, D	
148	29.1	340	[C ₂₁ H ₁₉ O ₁₁] ⁻	447.090 9	285.0405	5.4	8.4	kaempferol-hexoside	A, B, C, D, E	(Elsadig Karar & Kuhnert, 2016)
149	29.2	326	[C ₂₁ H ₁₉ O ₁₀] ⁻	431.098 3	268.0377	0.3	19.3	apigenin-hexoside	A, B, C, D, E	(Elsadig Karar & Kuhnert, 2016)
150	29.3	---	[C ₁₆ H ₁₅ O ₁₀] ⁻	367.066 8	161.0244; 133.0310	5.6	13.4	feruloyl(iso)citric acid	A, D, E	(Christof Bjöm Steingass et al., 2017)
151	29.3	---	[C ₃₁ H ₂₃ O ₉] ⁻	539.138 5	161.0244; 133.0294	-6.9	14.3	unidentified	A, B, C, D	
152	29.4	327	[C ₂₁ H ₁₉ O ₁₀] ⁻	431.098 1	161.0244; 133.0290	0.7	16	kaempferol rhamnoside	A, B, C, D, E	(Chamorro et al., 2019)
153	29.4	---	[C ₂₀ H ₃₃ O ₉] ⁻	417.209 8	161.0244; 133.0292	7.7	15.9	unidentified	A, E	
154	29.6	249;326	[C ₂₅ H ₂₃ O ₁₂] ⁻	515.121 2	161.0244; 133.0284	-3.2	1.7	4,5-dicaffeoylquinic acid ¹	A, D	(Olivares-Caro et al., 2020; Ruiz et al., 2013)
155	29.6	327	[C ₂₄ H ₂₅ O ₁₄] ⁻	537.106 3	375.0663; 173.0397	4.5	13.5	limocitrol-O-glucoside	A, D	(El-Sayed et al., 2017)
156	29.7	249	[C ₂₅ H ₂₃ O ₁₀] ⁻	483.129 2	289.0718; 109.0295; 373.0929; 193.0506	1	15.9	unidentified	E	

157	29.9	---	[C ₂₄ H ₁₉ O ₉] ⁻	451.1028	341.0667; 109.0295	1.5	9.5	cinchonain 1a	A, E	(Elsadig Karar & Kuhnert, 2016)
158	30.1	---	[C ₂₄ H ₂₃ O ₁₃] ⁻	519.1129	123.0452; 315.0510; 243.0299	2.9	11.8	unidentified	A	
159	30.2	290	[C ₂₄ H ₁₉ O ₉] ⁻	451.1026	341.0667; 109.0295	2	3.8	cinchonain 1a	A, E	(Elsadig Karar & Kuhnert, 2016)
160	30.3	---	[C ₂₁ H ₁₉ O ₁₁] ⁻	447.0934	285.0405; 151.0037	-0.7	8.2	kaempferol-hexoside	A, B, C, D, E	(Elsadig Karar & Kuhnert, 2016)
161	30.3	283	[C ₁₅ H ₁₁ O ₇] ⁻	303.0508	285.0405; 125.0244	0.8	14.9	Pentahydroxy flavanone	E	(Ruan et al., 2019)
162	30.4	249	[C ₂₄ H ₁₉ O ₉] ⁻	451.1037	341.0667; 109.0295; 233.0455	0.6	0.6	cinchonain 1a	A, E	(Elsadig Karar & Kuhnert, 2016)
163	30.4	---	[C ₂₄ H ₂₃ O ₁₃] ⁻	519.1132	315.0510; 299.0197; 299.0256	2.4	8.6	unidentified	A	
164	30.7	340	[C ₂₃ H ₂₁ O ₁₃] ⁻	505.0988	271.0248; 255.0299	0	14.9	unidentified	A, D, E	
165	30.7	249	[C ₃₄ H ₃₁ O ₈] ⁻	567.2082	359.1500; 300.0217; 300.0276	27	10.7	unidentified	D	
166	31.6	---	[C ₂₅ H ₃₁ O ₁₁] ⁻	507.1872	345.1344	-0.8	7.1	unidentified	D	
167	31.7	---	[C ₂₈ H ₃₇ O ₁₂] ⁻	565.2289	197.0397; 197.0455; 239.0561; 153.0557	0.3	6.6	unidentified	A	
168	32.1	---	[C ₂₁ H ₁₉ O ₁₀] ⁻	431.0969	286.0433	3.4	8.5	apigenin-hexoside	D, E	(Elsadig Karar & Kuhnert, 2016)

* A *Berberis microphylla*, B. *Berberis trigona*, C. *Berberis empetrifolia*, D. *Berberis vulgaris*, and E. *Berberis darwinii*. ^a tg = retention time (min) ^b λ (nm) = wavelength (nm) ^c mσ=A score value describing the difference between measured and theoretical isotopic pattern of the ion (Bruker parameter). ¹ Identification level one.

Table S2: Figure of merit of the quantitative method

Phenolic compounds	LOD ($\mu\text{mol/L}$)	LOQ ($\mu\text{mol/L}$)	Slope ($\text{L}/\mu\text{mol}$)	Slope SD ($\text{L}/\mu\text{mol}$)	Lineal range ($\mu\text{mol/L}$)
HCAD^a	0.0328	0.1097	37.06	1.31	0.11 - 1837,37
Flavonols	0.0414	0.1381	26.91	0.79	0.14 - 103,36

^aHCAD: hydroxycinnamic acid derivatives. LODs and LOQs were calculated through the signal to noise (S/N) method:
LOD: 3 S/N and LOQ 10 S/N

Table S5: Figure of merit of the total polyphenols (mg gallic acid L⁻¹)

	LOD ($\mu\text{mol/L}$)	LOQ ($\mu\text{mol/L}$)	Slope (L/ μmol)	Slope SD (L/ μmol)	Lineal range ($\mu\text{mol/L}$)	Sy/x	Equation	R²
FOLIN	5.28	17.59	0.0120	0.0001	17.58 - 150	0.0211	$y = 0,0120x + 0,0558$	0.9988

LOD and LOQ was based on Sy/x

4.1.2 **Artículo 2**

La segunda publicación se titula “**Aqueous infusion of *Berberis microphylla* G. Forst (Calafate) leaves, a new functional beverage**”, en la cual se obtuvieron los siguientes resultados:

Por primera vez se caracterizó una nueva infusión producida a partir de hojas de *Berberis microphylla* G. Forst (Calafate).

Mediante HPLC-DAD-ESI-MS/MS se detectaron 76 compuestos, principalmente HCAs, (n=32), ácidos benzoicos (n=7), flavonoles (n=24). Al comparar el perfil de extracción de los isómeros de ácidos cafeoilquínicos e isómeros de ácidos feruloilquínicos obtenidos de un extracto metanólico versus la infusión, se encontró que en la infusión los isómeros más polares se encontraban en mayor proporción en comparación a los isómeros que se obtuvieron en el extracto metanólico, lo que podría deberse a un efecto del solvente sobre la isomerización de los compuestos fenólicos.

La cuantificación de los HCAs presentes en la infusión se realizó mediante HPLC-DAD, obteniendo un total de 2497.85 ± 189.05 $\mu\text{mol/L}$ de HCAs. La concentración de flavonoles es mucho menos alcanzando 13.85 ± 7.99 $\mu\text{mol/L}$. Estos resultados son similares a las

concentraciones que se encuentran en café o yerba mate, indicando que la infusión de calafate es una prometedora fuente de compuestos fenólicos.

El análisis elemental de la infusión mediante la técnica de fluorescencia de rayos X por reflexión total (TXRF) mostró la presencia de varios metales, principalmente K, CA, Cl, P y S , además también se encontró pequeñas cantidades de Zn, Cu y Mn los cuales son cofactores de la enzimas Superóxido dismutasa (SOD), además no se encontraron metales tóxicos en la infusión, como As, o Hg no fueron detectados.

Se determinó por primera vez el efecto “*in vitro*” de una infusión de hojas de calafate sobre la acción de tres enzimas digestivas: lipasa, α -amilasa y α -glucosidasa, demostrando un efecto inhibitorio en los tres casos. El mecanismo que subyace esta inhibición no se totalmente dilucidados aún, pero existen antecedentes que indican que el ácido cafeico, ácido cumárico y quercetina son capaces de unirse al sitio activo de la lipasa ¹⁰⁵. Por lo tanto, la infusión se presenta como una interesante alternativa para actuar como alimento funcional.

Se determinó el efecto de la infusión sobre la agregación del péptido A β , mostrando que diluciones de hasta 100 veces poseían un efecto significativamente inhibitorio.

Se evaluó la citotoxicidad de la infusión en dos modelos celulares distintos, en un cultivo primario de células endoteliales embrionarias (células HUVEC) y en una línea celular derivadas de la médula suprarrenal de ratas con origen embrionario de la cresta neural (células PC12).

En células HUVEC la infusión no tuvo un efecto significativo sobre la viabilidad en diluciones mayores a 1:12. En cambio, en células PC12 la infusión de calafate tuvo un efecto significativo sobre la viabilidad hasta diluciones de 1:20, lo que sugiere la existencia de diferentes mecanismos de acción entre ambos tipos celulares.

Por otro lado, se evaluó el efecto de la infusión sobre los ROS generados por H₂O₂ en células HUVEC, mostrando un significativo efecto protector de la infusión sobre los ROS generados. Lo que sugiere que los compuestos fenólicos presentes en la infusión tienen un potente efecto antioxidantes.

Los resultados obtenidos en la siguiente publicación sugieren que una infusión de hojas de calafate posee una destacada capacidad antioxidante y efectos antilipídicos y antiglicémicos, lo que la convierte en una excelente opción como alimento funcional. No obstante, es necesario seguir realizando estudios para determinar su seguridad alimentaria.

1 **AQUEOUS INFUSION OF *Berberis microphylla* G. Forst (CALAFATE) LEAVES, A NEW**
2 **FUNCTIONAL BEVERAGE**

3 Daniela Nova-Baza^{a,b}, Lia Olivares-Caro ^a, Alejandro Vallejos^d, Daniela Mennickent^a, Francisco
4 Sáez-Orellana^b, Luis Bustamante^a, Claudia Radojkovic^c, Carola Vergara^a, Jorge Fuentealba^b and
5 Claudia Mardones^{a,e*}

6 ^a Departamento de Análisis Instrumental, Facultad de Farmacia, Universidad de Concepción,
7 Concepción, Chile; ^b Departamento de Fisiología, Facultad de Ciencias Biológicas, Universidad de
8 Concepción, Concepción, Chile; ^c Departamento de Bioquímica Clínica e Inmunología, Facultad
9 de Farmacia, Universidad de Concepción, Concepción, Chile; ^d Grupo Interdisciplinario de
10 Biotecnología Marina (GIBMAR), Centro de Biotecnología, Universidad de Concepción,
11 Concepción, Chile; ^e Unidad de Desarrollo Tecnológico, Universidad de Concepción, Coronel,
12 Chile. * Correspondence: cmardone@udec.cl; Tel: +56-983616340
13

14 **Abstract**

15 Calafate is a non-perennial shrub that grows in the South American Patagonia. This plant has been
16 used in traditional medicine to treat pathological conditions as fever, inflammation, and infections,
17 among others. Its fruit has high levels of anthocyanins and hydroxycinnamic acids, and a high
18 antioxidant capacity. Its consumption produces systemic changes associated with the protection
19 against atherosclerosis. Bioactive compounds as berberine and other alkaloids, are detected in
20 leaves, branches, and roots. Recently, 108 compounds, mainly hydroxycinnamic acids, flavonols,
21 and berberine were identified in methanolic Calafate leaves extract_j. Due to their high content of
22 these bioactive compounds, we developed an infusion of Calafate leaves, prepared in hot water,
23 as a potential functional beverage. The chemical characterization of the infusion was performed by
24 UHPLC-HR-MS and TXRF. *In vitro* antioxidant capacity, cell cytotoxicity, and cell oxidative stress
25 assays were used to evaluate bioactivity. Bioactivity against non-transmissible pathologies was

[Escriba aquí]

26 assessed by inhibition of both A β aggregation and gastrointestinal enzymes, as a way to evaluate
27 its potential effect on reducing the risk of Alzheimer's disease and metabolic syndrome,
28 respectively. The results show that Calafate infusion is rich in hydroxycinnamic acids, does not
29 contain toxic metals, can reduce oxidative stress, reduces A β aggregation, and has hypoglycemic
30 and hypolipidemic effects. These results support the usage of Calafate leaves aqueous infusion as
31 a new functional beverage.

32

33 **Keywords:**

34 Infusion, calafate leaves, metabolic syndrome, Alzheimer's disease, phenolic compounds

35 **1. Introduction**

36 The use of medicinal plants to improve health has triggered the interest of scientific researchers to
37 study the biological properties and active principles responsible for these therapeutic effects (Salehi
38 et al., 2019). The Mediterranean diet pyramid suggests consuming sugar-free herbal infusions, tea,
39 and low-sodium broths, as they can help to complete the requirements of a healthy and balanced
40 diet (Bach-Faig et al., 2011). In addition, teas and infusions have been consumed for several
41 thousands of years in China and have shown to be non-toxic (S. Li et al., 2013).

42 Many of the health benefits of herbal medicines and plants are associated with their high content
43 of phenolic compounds, which are known for their high antioxidant capacity (S. Li et al., 2013) and
44 their potential to prevent specific diseases due to their bioactivity (Valduga et al., 2019).
45 Nevertheless, the bioactivity of herbal tea and infusions depend on the capacity of their bioactive
46 constituents to resist high temperatures, since they are prepared with boiling water (S. Li et al.,
47 2013). These herbal solutions can be directly used as part of functional foods or complex traditional
48 medicines (S. Li et al., 2013).

49 Calafate (*Berberis microphylla* G. Forst) is a small perennial tree that produces subglobular dark
50 blue berries. It is a wild plant extensively distributed in the south of Chile and Argentina (Marticorena

[Escriba aquí]

51 & Rodriguez, 2003). Its fruit is considered a superfruit, due to its high concentration of polyphenols,
52 such as anthocyanins, hydroxycinnamic acids (HCAs), and flavonols (Ruiz et al., 2010, 2013; Ruiz,
53 Mardones, et al., 2014). Several studies have revealed the antioxidant effect and bioactivity of the
54 Calafate fruit (Bustamante et al., 2017; Olivares-Caro et al., 2020; Reyes-Farias et al., 2016;
55 Sánchez Gutiérrez & Guzmán Pincheira, 2021; Schmeda-Hirschmann et al., 2019). However, few
56 studies have focused on the characterization of Calafate. (Manosalva et al., 2014; Nova-Baza et
57 al., 2022; Ruiz, Zapata, et al., 2014)

58 **Figure 1** shows a photograph of Calafate leaves. Recently, Nova-Baza et al (2022) determined the
59 chemical composition of leaves from Calafate and other species of the Berberis genus by HPLC-
60 QTOF and GC-MS (Nova-Baza et al., 2022). 108 compounds were found in the methanolic extract
61 of Calafate leaves, with a high concentration of HCAs ($183.0 \pm 18.9 \mu\text{mol/g}$ dry weight (DW)),
62 flavonols ($1.9 \pm 0.6 \mu\text{mol/g}$ DW) and essential fatty acids ($4.84 \pm 0.85 \text{ mg/g}$ DW). The antioxidant
63 capacity of this extract also stood out in comparison to that of other leaves. The compounds
64 identified in Calafate leaves also included alkaloids. These compounds have been widely described
65 in the Berberis genus (Nova-Baza et al., 2022), being berberine the most abundant. Berberine is
66 known for having antidiarrheal activity, anti-inflammatory activity, antiplatelet effects, antimicrobial
67 activity, cardiovascular effects, effects on smooth muscle, immunological effects, and antidiabetic
68 effects (Cepae, 1999; Salehi et al., 2019; Y. Zhang et al., 2008). Moreover, concentrations of ~1000
69 mg/day of berberine have been used in replacement of metformin for the treatment of type 2
70 diabetes (Y. Zhang et al., 2008). In a dichloromethane extract of Calafate leaves, the main alkaloids
71 detected by HPLC-MS were berberine, jatrorrhizine, and palmatine (Ruiz, Zapata, et al., 2014).
72 However, the presence of berberine is not expected in aqueous extracts, such as teas and
73 infusions, due to its low solubility in water.

74

[Escriba aquí]



75

76 **Figure 1:** Leaves of *Berberis microphylla* G. Forst from Chilean Patagonia.

77

78 Several pathological conditions, such as metabolic syndrome, Alzheimer's disease (AD),
79 atherosclerosis, and cancer, are associated with oxidative stress (Forman, 2021; Russo et al.,
80 2018). On this basis, HCAs have been described as health-promoting compounds, due to their
81 potent antioxidant effect, and their consequent usefulness for the prevention of these diseases. For
82 example, HCAs have been widely studied in the context of metabolic syndrome, due to their
83 antioxidant, anti-inflammatory, antilipidemic, antidiabetic, and antihypertensive activity (Santana-
84 Gálvez et al., 2017). These compounds have also been linked to the reversal of cognitive deficits
85 in animal models of AD (Matthews et al., 2020). The misfolding and the extracellular aggregation
86 of A β peptide have been described as the main cause of AD progression (Pagano et al., 2020).
87 Interestingly, several natural compounds are able to reduce A β aggregation, e.g. the combination
88 of chlorogenic acid with selenium nanoparticles (Yang et al., 2018). The protective effect of this

[Escriba aquí]

89 HCA against A β -induced neurotoxicity is associated with a reduction of intracellular calcium influx,
90 and a decrease in A β -induced apoptosis (Lee et al., 2011).

91 Taking into consideration the profile of compounds previously described in methanolic extracts of
92 Calafate leaves, this research aims to develop a new functional Calafate infusion (CI) based on
93 *Berberis microphylla* G. Forst leaves, and provide novel scientific evidence about its composition
94 and bioactivity. This study includes the identification and quantification of its main phenolic
95 compounds and metals, and the description of its bioactivity to reduce oxidative stress and
96 cytotoxicity, and potentially prevent Alzheimer's disease and metabolic syndrome.

97

98 **2. Materials and Methods**

99 **2.1. Equipment**

100 An analytical balance from Denver Instrument Company (New York, New York, USA), a Series
101 4710 ultrasonic bar homogenizer from Cole Palmer (Chicago, Illinois, USA), a Stuart S01
102 mechanical shaker from Bibby Scientific LTD (Stanford, UK), a HERAUS FRESCO 17 centrifuge
103 from Thermo Fisher Scientific (Germany), a 3-16p Christ centrifuge from Sigma (Osterode,
104 Germany) and a rotary evaporator with a V-700 vacuum pump and a V-850 controller system from
105 Büchi (Flawil, Switzerland) were used for samples preparation.

106 An Epoch™ microplate reader from Biotek Instruments (Winooski, Vermont, USA) was used for
107 total polyphenols, antioxidant capacity, and enzymatic determinations. A NOVostar multi-plate
108 reader (MG, Labtech, Germany) was used for the Thioflavin T fluorescence assay.

109 The following equipment and software (Bruker and Bruker Daltonik GmbH, Germany) were used
110 for the identification of phenolic compounds and other metabolites in the CI: for sample analysis, a
111 HPLC Elute LC system coupled in tandem with a Compact Q-TOF mass spectrometer; for system
112 control, Compass HyStar; for data acquisition, QTOF Control 4.1.402.322-7977-vc110 6.3.3.11;
113 and for data analysis, Compass Data Analysis 4.4.

[Escriba aquí]

114 For HCA and berberine quantification, the following equipment were used: a HPLC-DAD-FL from
115 Shimadzu (Tokyo, Japan) equipped with a quaternary LC-10ADVP pump, a FCV-10ALVP elution
116 unit, a DGU-14A degasser unit, a CTO-10AVP oven, a SPD-M20A DAD detector and a RF-20A xs
117 fluorescence detector. Instrument control and data collection were carried out using the CLASS-
118 VP DAD Shimadzu Chromatography Data System and Analyst software (1.5.2 version).
119 Metal profile analysis was performed using a benchtop TXRF system (S4 TStar, Bruker AXS
120 Microanalysis GmbH, Berlin, Germany) equipped with a 50 W X-ray tube with a molybdenum (Mo)
121 anode and a multilayer monochromator (17.5 keV).

122

123 **2.2. Reagents, Standards, and Extraction Materials**

124 Commercial standards of 3-caffeoylquinic acid, berberine hydrochloride (<90%), neocuproine
125 hemihydrate, 6-hydroxy-2,5,7,8-tetramethylchromane-2-carboxylic acid (Trolox), 2,2'-azino-bis(3-
126 ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid) (ABTS), fluorescein sodium salt, 2,2'-azobis(2-methyl-
127 propionamide)dihydro-chloride (AAPH), 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium
128 bromide (MTT), α -glucosidase (G5003), α -amylase (A6255), lipase (L3126), p-nitrophenyl- α -D-
129 Glucopyranoside (pNPG, N1377), blocked p-nitrophenyl- α -D-maltoheptaoside (BpNPG7, N5665),
130 and p-nitrophenyl butyrate (pNPB, N9876) were obtained from Sigma-Aldrich. Gallium standard,
131 formic acid, hydrochloric acid, and HPLC grade solvents (acetonitrile, methanol, and water) were
132 acquired from Merck (Darmstadt, Germany). 2',7'-Dichlorodihydrofluorescein diacetate (H₂DCF-
133 DA) was purchased from Invitrogen (Waltham, MA, USA). M199 medium, fetal bovine serum
134 (FBS), and other cell culture reagents, were obtained from Gibco Life Technologies (Grand Island,
135 NY, USA). Penicillin-streptomycin solution and Trypsin 0.25% were acquired from HyClone Co.
136 (Logan, UT, USA). Dimethyl sulfoxide (DMSO) and Vitamin C were obtained from Merck
137 (Darmstadt, Germany). Carbonyl Cyanide 4-(Trifluoromethoxy)phenylhydrazone (FCCP) and 2-[4-

[Escriba aqui]

138 (dimethylamino)phenyl]-3,6-dimethyl-1,3-benzothiazol-3-ium (Thioflavin T) were purchased from
139 Ambeed (Arlington, USA).

140

141 **2.3. Plant Material**

142 The *Berberis microphylla* leaves samples were collected in Chilean Patagonia, in two particular
143 locations (37–54° S and 74–69° W) of Coyhaique, between 2017 and 2019. The samples
144 classification was made by a taxonomy expert, by comparison with specimens from the Herbarium
145 of Universidad de Concepción. The samples were dried at 40°C protected from light and then 500
146 g were ground with a stainless steel grinder.

147

148 **2.4. Calafate Infusion (CI) preparation**

149 The CI was prepared in a beaker with ground leaves (0.25 g) and 25 mL of just boiled nanopure
150 H₂O, following the commercial indication of tea manufacturers (Jäger et al., 2011). The CI (2.0 mL)
151 was taken after 5, 10, and 15 min without replacing the removed volume, and was directly used for
152 total polyphenols and antioxidant capacity analyses. For the *in vitro* assays with HUVEC cells, the
153 dilutions used of CI were 1:3 (3.33 g DW /L); 1:12 (0.83 g DW /L); 1:30 (0.33 g DW /L), and 1:60
154 (0.16 g DW /L). In the viability assay with PC12 cells, and in the Thioflavin T assay, the dilutions
155 used were 1:5 (2 g DW /L); 1:20 (0.5 g DW /L); 1:50 (0.2 g DW /L), and 1:100 (0.1 g DW /L). The
156 HPLC analyses were carried out after freeze-drying the CI, and reconstituting in mobile phase. The
157 results were expressed as mg or μ mol per liter of infusion. The unit mg per cup (200 mL) of infusion
158 was also considered for comparative discussion. Prior to lyophilization, a methanolic extract of
159 Calafate leaves was prepared as described by Nova-Baza et al., 2022 (Nova-Baza et al., 2022)
160 and then reconstituted in mobile phase to compare with the CI profile.

161

162 **2.5. Identification of the main CI compounds by HPLC-QTOF-MS/MS**

[Escriba aquí]

163 The chromatographic separation was performed using a C18 column (Kromasil 250 mm × 4.6 mm
164 × 5 μm) with a C18 precolumn (Nova-Pak 22 mm × 3.9 mm × 4 μm; Waters, Milford, MA, USA) at
165 30°C. The mobile phase consisted of 0.1% formic acid in water and acetonitrile at a flow rate of 0.3
166 mL/min. The acetonitrile gradient ranged from 15% to 25% for 14 min, 25% to 35% for 11 min, 35%
167 to 100% for 1 min, and 100% to 15% for 1 min, with a stabilization period of 25 min. The injection
168 volume was 10 μL in partial loop mode (45 μL are measured, and 10 of them are co-injected with
169 solvent). Two milliliters of CI taken 15 min after preparation were freeze-dried and reconstituted in
170 the initial mobile phase (mix of formic acid 0.1% and acetonitrile 85:25 v/v) for the characterization
171 of the main phenolic compounds in the beverage.

172 The MS/MS conditions were: ESI mode over a mass range of 50-1500 m/z, with a scan duration of
173 0.2 sec in centroid mode; positive and negative ionizations were performed in different
174 chromatographic injections. The collision energy was set at 10 and 25 eV in stepping mode. The
175 source parameters were set as follows: end capillary 500 V, capillary for negative scan 3500 V,
176 nebulizer 4 bar, dry gas 9 L/min, and dry temp 200 °C. The conditions for the auto MS/MS were: 4
177 precursors/cycle and active exclusion after 1 spectrum. Internal calibration was carried out using
178 sodium formate (10% formic acid, 1 M) with a mass accuracy of less than 3 ppm. The assignment
179 of identity was carried out using PubChem, METFRAG, METLIN, HMDB, and KEEG databases.
180 The MS data were also compared with those of other publications and with standards.

181

182 **2.6. Quantification of HCAs and Berberine by HPLC-DAD-FL**

183 For the determination of HCAs in the CI, an external calibration with the 3-caffeoylquinic acid (3-
184 CQ) standard at 320 nm was used. Standard solutions were prepared at 6 concentration levels in
185 ethanol. The CI, obtained after 15 min of infusion, was lyophilized and reconstituted in the mobile
186 phase. The chromatographic method was the same as described in 2.5. The concentration of each

[Escriba aquí]

187 HCA was determined as 3-CQ. The analytical method validation included linearity range, precision,
188 detection limit, and accuracy.

189 The quantification of berberine in the CI was carried out using the protocol described by Ruiz et al.,
190 (2014) (Ruiz, Zapata, et al., 2014). A C₁₈ column (Kromasil C₁₈ XDB, 5 µm, 250 × 4.6 mm) with a
191 C₁₈ precolumn (Nova-Pak Waters, 4 µm, 22 × 3.9 mm) at 30 °C were used. The mobile phase
192 (flow rate of 1 mL/min) consisted of 0.1% of formic acid in water (A) and acetonitrile (B). The
193 gradient started with 80% A for 1 min, then from 80 to 50% in 10 min, from 50 to 0% in 1 min,
194 maintained the proportion for 5 min, and ended with a final stabilization step of 80% A for 10 min.
195 Two milliliters of the CI, obtained after 15 min of infusion, were lyophilized and reconstituted in the
196 mobile phase (mix of 0.1% formic acid and acetonitrile 80;20 v/v) for the HPLC-FL analysis. The
197 injection volume was 25 µL, and the detector was set at 350 and 530 nm for the excitation and
198 emission wavelengths, respectively. The quantitative analysis was carried out by external
199 calibration with the berberine standard. The analytical validation of the method included linearity
200 range, limit of detection, intermediary precision, and accuracy.

201

202 **2.7. Total polyphenol content and antioxidant capacity**

203 TEAC_{CUPRAC}, TEAC_{ABTS}, and TEAC_{ORAC} assays were performed on the CI. TEAC_{CUPRAC} assays
204 were conducted in 96-well microplates. To each well, 50 µL of solution (10 mM copper (II) solution,
205 7.5 mM neocuproine solution, and 1 M pH 7 buffer) were added, and then incubated at 37°C for 15
206 min before adding 100 µL of TROLOX solution or sample. Then, the plates were incubated at 37°C
207 for 30 min, after which absorbance was determined at 450 nm using a microplate reader
208 (Costar3695® 96). To evaluate the intrinsic absorbance of samples, copper (II) and neocuproine
209 solutions were replaced by 100 µL of Milli-Q water. TEAC_{ABTS} and TEAC_{ORAC} assays were
210 performed according to Nova-Baza et al. (2022) and Ou et al. (2013), respectively (Nova-Baza et
211 al., 2022; Ou et al., 2013).

[Escriba aqui]

212

213 **2.8. Elements determination by total reflection X-ray fluorescence (TXRF)**

214 **analysis**

215 The identification and quantification of elements was carried out by TXRF. Prior to the instrumental
216 measurement, 10 μL of a solution of silicone in isopropanol were dropped on the surface of the
217 quartz carrier, and dried at 110°C on a hot plate. Then, 10 μL of the CI, obtained after 15 min of
218 infusion, were prepared with 500 $\mu\text{g/L}$ of Ga as internal standard (IS), and dropped on the
219 siliconized quartz carrier. After drying the samples at 80°C , they were placed into the TXRF
220 equipment. The elements concentrations were expressed as mg per CI liter (mg/L).

221

222 **2.9. Protective potential of CI for Alzheimer's disease: effect on A β aggregation**

223 The activity of the CI to reduce A β peptide aggregation was performed by the Thioflavin T (ThT,
224 ex: 440 nm, em: 485 nm) fluorescence assay on a 96-microwell plate. This assay is based on the
225 fact that ThT increases the fluorescent signal intensity upon incorporation into beta sheets (LeVine,
226 Harry, 1993). Several dilutions of CI with 20 μM ThT were used. The plate was kept at 37°C in
227 orbital agitation at 500 rpm for A β aggregation. ThT fluorescence intensity was measured every 3
228 min for 4 h using a NOVOstar multi-plate reader.

229

230 **2.10. Cellular cytotoxicity and protective effect of CI on HUVEC and PC12**

231 **models**

232 Cell cultures of human umbilical vein endothelial cells (HUVECs) (Lonza Group) were carried out
233 on gelatin-coated plastic dishes with M199 medium supplemented with 20% FBS at 37°C with 5%
234 CO_2 (Olivares-Caro et al., 2020).

235 HUVECs cell viability was determined by the MTT method. The cells were recovered with Trypsin/
236 ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA) and plated on a 96-well plate. The cells were pretreated

[Escriba aqui]

237 for 24 h with different dilutions of CI, obtained by 15 min of infusion, in culture medium
238 supplemented with 2% FBS or 10 mM phosphate buffered saline (PBS), composed of 145 mM
239 NaCl, 7.5 mM Na₂HPO₄ and 2.5 mM NaH₂PO₄ (pH 7.2–7.4). The assay with PBS was used as a
240 positive control to induce cell death by serum deprivation. After the pretreatment period, cells were
241 incubated with the MTT solution at a final concentration of 0.5 mg/mL for 4 h at 37°C. Then, 85 µL
242 of the medium were removed, and DMSO (50 µL) was added to each well. The absorbance was
243 measured at 540 nm using a microplate reader. Cell viability was calculated using non-treated cells
244 cultured in M199 medium with 2% FBS as the viability control (Olivares-Caro et al., 2020).

245 PC-12 cells (ATCC CRL-1721, USA) were cultured in Dulbecco's modified Eagle's medium
246 (DMEM) (Hyclone, USA) with 5% FBS, 5% horse serum, 100 U/ml penicillin, 100 g/ml streptomycin,
247 and 2 mM L-glutamine. Cells were incubated under standard conditions (37°C, 5% CO₂) (Castillo
248 et al., 2019). PC-12 cell cultures were plated at a density of 30,000 cells/well and used 24 h after
249 plating. After exposing the cells to each dilution (2.4 section), they were incubated with MTT using
250 the same procedure of HUVECs cells. FCCP (1 µM), a mitochondrial uncoupler molecule, was
251 used as a negative control considering that mitochondrial uncoupling induces cell death. The same
252 procedure was used to measure the protective effect of CI against oxidative stress on PC12 cells.

253 The intracellular ROS measurement was based on the ROS-mediated conversion of the
254 nonfluorescent probe H₂DCFH-DA into dichlorofluorescein (DCF), which intensity of fluorescence
255 indicates increased oxidative stress. For these experiments, HUVECs were plated in 96-well plates
256 at a density of 30,000 cells per well, and after 1 day, they were incubated with the respective
257 dilutions of CI, obtained from 15 min of infusion, for another 24 h. Then, the cells were washed with
258 10 mM PBS and incubated with H₂DCFH-DA (10 µM) in 10 mM PBS at 37°C for 45 min. At the
259 end of the incubation period, cells were washed and stimulated with H₂O₂ (200 µM), and the DCF
260 fluorescence was measured (ex: 485 nm; em: 540 nm) after 45 min. Cells exposed to H₂O₂ but not
261 to the CI were used as a positive control of oxidative stress. The results were expressed as a fold

[Escriba aqui]

262 change of the fluorescence intensity between stimulated and non-stimulated HUVECs, with cells
263 not exposed to CI or H₂O₂ as negative control (Olivares-Caro et al., 2020). The antioxidant control,
264 vitamin C (250 µg/mL), was added to cell cultures at the same time as H₂O₂.

265

266 **2.11. Protective potential of CI for metabolic syndrome: effect on** 267 **enzymatic activity**

268 The effect of the CI on α-glucosidase, α-amylase, and lipase activity was evaluated. The CI,
269 obtained after 15 min of infusion, was diluted 10 times in the corresponding enzyme activity buffer,
270 and then used for the inhibition assay. The substrates used for all enzymes released p-nitrophenol,
271 which absorbance was measured at 400 nm in a multi-plate reader (Synergy HTX, BioTek)
272 employing the kinetic mode. The kinetics data were analyzed using non-linear regression in the
273 GraphPad Prism software. The slope of the linear portion of the kinetics data corresponds to the
274 initial velocity (Vi) expressed in absorbance per min (Abs min⁻¹). In addition, the results were
275 expressed in inhibition percentage (%). The positive control was the non-inhibited reaction. Two
276 additional controls were considered: control without enzyme (which was subtracted from the
277 sample's absorbance) and control without infusion (positive control).

278 The α-glucosidase activity was measured using the substrate pNPG according to Zhang et al.,
279 2011 (L. Zhang et al., 2011) with some modifications. Briefly, a reaction solution of 140 µL of
280 potassium phosphate buffer (PBS, pH 6.8) and 20 µL of enzyme solution (25 µg/mL) were
281 incubated at 37°C for 15 min in the presence (20 µL) or absence of CI. Then, the absorbance
282 measurement started with the addition of 20 µL of the substrate (25 mM) to each well for 30 min at
283 37°C.

284 The α-amylase activity was determined according to (Fais et al., 2018)(Fais et al., 2018) with some
285 modifications. Briefly, BpNPG7 was used as substrate. A reaction solution composed of 60 µL of
286 PBS (pH 7.0), 20 µL of NaCl (1M) and 40 µL of α-amylase (1 mg/mL) was used and incubated at

[Escriba aquí]

287 37°C for 15 min in the presence (50 µL) or absence of the CI. Then, the absorbance measurement
288 started with the addition of 80 µL of the substrate (7.9 mM) to each well for 30 min at 37°C.
289 The lipase activity was assessed using the substrate pNPB according to (Roh & Jung, 2012)(Roh
290 & Jung, 2012) with some modifications. Briefly, a reaction solution composed of 200 µL of PBS (pH
291 7.2, 0.1% Tween 80) and 25 µL of the enzyme (0.5 mg/mL) was incubated at 30°C for 30 min in
292 the presence (20 µL) or absence of the CI. Then, the absorbance measurement started with the
293 addition of 5 µL of the substrate (25 mM), all in a final volume of 250 µL, for 30 min at 30°C.

294

295 **2.12. Statistical analyses**

296 Data were analyzed by one-way ANOVA and Bonferroni multi-comparison test in GraphPad Prism
297 (9.5.00 version). Data passed the ANOVA prerequisites (Shapiro-Wilk normality and Bartlett
298 homoscedasticity, both with $p < 0.05$). The significance levels were: * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$
299 and **** $p < 0.0001$. The sample size (n) is shown in each figure.

300

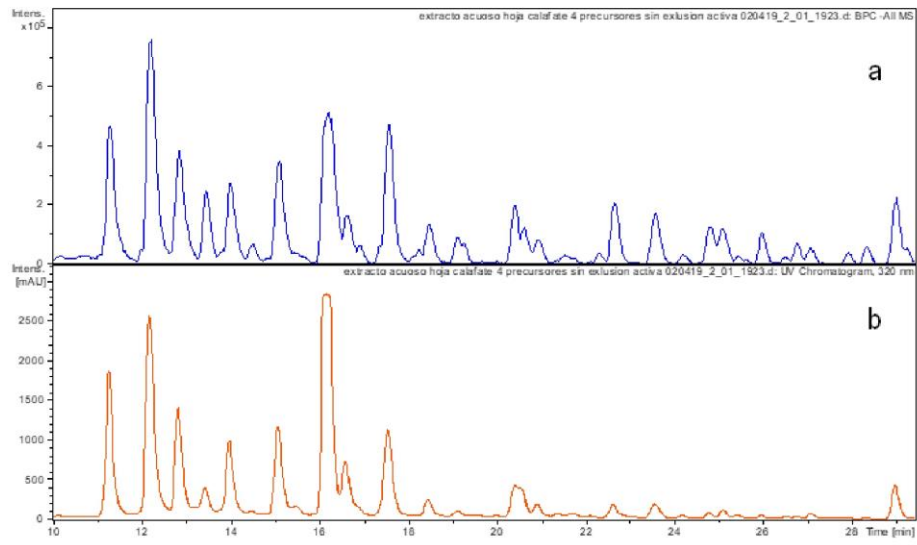
301 **3. Results and Discussion**

302 **3.1. Metabolic profile of Calafate infusion (CI)**

303 The CI prepared for 15 min in boiling water following the commercial indication for tea preparations,
304 was analyzed by HPLC-ESI-QTOF-MS/MS in negative mode, due to the better ionization of
305 flavonols and HCAs under this working condition. The base peak chromatogram (BPC) of the
306 infusion is shown in Figure 2a, and both the spectrometric characteristics and the retention times
307 of the detected compounds are summarized in **Table 1**. HCAs were the most diverse and abundant
308 compounds identified in the beverage. There were 31 HCAs, followed by 24 flavonols, 7 benzoic
309 acid derivatives, 2 monoterpenes and 1 lignan. Nine compounds were annotated with identification
310 level A, according to the classification of Alseekh et al., 2021 (Alseekh et al., 2021), whereas 11
311 compounds were not identified.

[Escriba aquí]

312



313

314 **Figure 2:** Calafate infusion chromatograms obtained by HPLC-DAD-QTOF-MS/MS. a) Base Peak

315 Chromatogram (BPC); b) UV-Chromatogram at 320 nm.

316

[Escriba aquí]

Table 1: Metabolic profile of Calafate infusion obtained by HPLC-DAD-QTOF-MS/MS.

Peak	t _R (min)	λ (nm)	Molecular Formula	(M-H)	Ionic fragments	Error (ppm)	Annotation	Reference ^c	Chemical family
1	10.9	321	[C ₁₄ H ₁₇ O ₈]	329.0886	152.0115; 167.0350	-2.4	1-O-vanilloyl-beta-D-glucose ^b	(Chamorro et al., 2019)	Benzoic acid
2	11.1	---	[C ₁₄ H ₁₉ O ₈]	315.1087	153.0557	-0.5	dihydroxybenzoic acid hexoside ^b	(Cabañas-García et al., 2019; Elsadig Karar & Kuhnert, 2016)	Benzoic acid
3	11.3	326	[C ₁₅ H ₁₅ O ₁₁]	371.0621	209.0303; 191.0197; 135.0452; 179.0350	-0.4	3- or 4-trans- caffeoyl-glucaric acid ^b	(Olivares-Caro et al., 2020; Ruiz, Mardones, et al., 2014)	HCA
4	11.9		[C ₁₃ H ₁₅ O ₈]	315.0726	109.0295	-1.3	protocatechuic acid glucoside ^a	(Cabañas-García et al., 2019; Z. Chen et al., 2017; da Costa et al., 2016; Elsadig Karar & Kuhnert, 2016; Gu et al., 2015)	Benzoic acid
5	12.1	326	[C ₁₅ H ₁₅ O ₁₁]	371.0625	209.0303; 191.0197; 135.0452; 179.0350	-1.3	3- or 4-trans- caffeoyl-glucaric acid ^b	(Olivares-Caro et al., 2020; Ruiz, Mardones, et al., 2014)	HCA
6	12.5		[C ₁₇ H ₂₃ O ₁₁]	403.1512	223.0612; 193.0142; 208.0377; 123.0088	-1.3	gardenoside ^b	(Neri-Numa et al., 2020)	Monoterpenoid
[Escriba aquí]									
7	12.8	329	[C ₁₅ H ₁₅ O ₁₁]	371.0627	209.0303; 191.0197; 135.0452; 179.0350	1.8	2- or 5-trans-caffeoyl-glucaric acid ^b	(Olivares-Caro et al., 2020; Ruiz, Mardones, et al., 2014);	HCA
8	13.1		[C ₁₄ H ₁₅ O ₈]	311.0775	189.0557; 135.0452; 149.0608	-1	unidentified		
9	13.4	325	[C ₁₆ H ₁₇ O ₈]	353.0882	191.0561; 179.0350; 135.0452; 161.0244	-1.2	5-caffeoylquinic acid ^a	(Olivares-Caro et al., 2020; Ruiz et al., 2013)	HCA
10	13.6	328	[C ₁₅ H ₁₉ O ₁₀]	359.0989	197.0455	-1.4	Glucosyringic acid ^b	(S. D. Chen et al., 2014; Elsadig Karar & Kuhnert, 2016)	Benzoic acid
11	13.9	329	[C ₁₅ H ₁₅ O ₁₁]	371.0627	209.0303; 191.0197; 135.0452; 179.0350	2	2- or 5-trans-caffeoyl-glucaric acid ^b	(Olivares-Caro et al., 2020; Ruiz, Mardones, et al., 2014)	HCA
12	14.4	326	[C ₂₁ H ₂₃ O ₁₄]	499.1094	149.0608; 193.0506	-0.2	unidentified		
13	14.7		[C ₂₁ H ₂₁ O ₁₂]	465.1059	303.0510; 285.0405	-4.4	plantagoside ^b	(Matsuura et al., 2014; Nie et al., 2021; Wang et al., 2016)	Flavonoide
14	15	329	[C ₁₅ H ₁₅ O ₁₀]	353.0517	191.0561; 135.0452; 147.0299; 179.0350; 161.0244;	-0.7	caffeoylisocitric acid isomer ^b	(Steingass et al., 2017)	HCA
15	15.5	326	[C ₁₅ H ₁₇ O ₈]	341.0860	179.0350; 135.0452; 161.0244; 117.0346	-0.1	caffeoyl-glucoside ^b	(Steingass et al., 2015; Y. Zhang et al., 2018)	HCA
16	15.9	320	[C ₁₅ H ₁₉ O ₈]	343.1040	181.0506; 137.0608	-4.6	pleoside ^b	(Larrazábal-Fuentes et al., 2020)	Benzoic acid

[Escriba aquí]

17	16.3	321	[C ₁₈ H ₁₇ O ₈]	353.0881	191.0561; 93.0346; 161.0244; 127.0401; 135.0452; 173.0455; 161.0244	-0.9	3-caffeoylquinic acid ^A	(Olivares-Caro et al., 2020; Ruiz et al., 2013)	HCA
18	16.6	328	[C ₁₅ H ₁₃ O ₁₀]	353.0515	191.0561; 161.0244; 191.0197; 147.0299; 135.0452; 179.0350	0.2	caffeoylisocitric acid isomer ^B	(Steingass et al., 2017)	HCA
19	16.6	328	[C ₁₄ H ₁₃ O ₈]	309.0602	133.0295; 147.0240; 147.0299	0.8	unidentified		
20	16.9		[C ₁₈ H ₁₅ O ₈]	359.0776	135.0452; 243.0663; 109.0295; 179.0350; 161.0608	-1	rosmarinic acid ^B	(Krzyzanowska-Kowalczyk et al., 2018; J. Zhang et al., 2019)	HCA
21	17.6	329	[C ₁₅ H ₁₃ O ₁₀]	353.0515	191.0197; 147.0299; 179.0350	0.3	caffeoylisocitric acid isomer ^B	(Steingass et al., 2017)	HCA
22	17.7	328	[C ₁₇ H ₁₉ O ₉]	367.1039	193.0506; 134.0373; 173.0455	1.1	feruloylquinic acid isomer ^B	(Ruan et al., 2019)	HCA
23	18.1		[C ₁₈ H ₁₅ O ₈]	359.0769	271.0976; 243.0663; 109.0295; 135.0452;	-1.1	unidentified		
24	18.2	326	[C ₁₇ H ₂₁ O ₁₀]	385.1144	175.0037; 223.0618; 265.0718	-1	sinapic acid hexoside ^B	(Mekky et al., 2019)	HCA
25	18.2	326	[C ₁₈ H ₂₇ O ₁₂]	447.1502	401.1453; 269.1031; 161.0455	1.2	benzyl alcohol-hexose-pentose + HCOOH ^B	(Bystrom et al., 2008)	Benzoic acid
26	18.2		[C ₂₀ H ₃₁ O ₁₀]	431.1918	179.0502; 179.0561; 101.0244	1	unidentified		

[Escriba aquí]

27	18.5	323	[C ₂₄ H ₂₁ O ₁₄]	533.0935	209.0303; 371.0620; 191.0197; 147.0299; 129.0193; 179.0350; 135.0452	0.4	Dicafeoylglucaric isomer ^B	(Maas et al., 2009; Ruiz et al., 2013)	HCA
28	19.1	321	[C ₁₈ H ₁₇ O ₈]	353.0881	191.0561; 161.0244; 127.0401; 93.0346	-0.2	caffeoylquinic acid isomer ^B	(Olivares-Caro et al., 2020; Ruiz et al., 2013)	HCA
29	19.3	326	[C ₂₀ H ₃₁ O ₁₀]	431.1922	385.1868; 153.0921; 223.1340; 205.1234; 161.0455	0.1	unidentified		
30	20.4	326	[C ₂₄ H ₂₁ O ₁₄]	533.0940	209.0303; 371.0620; 179.0350; 147.0299; 135.0452	0.6	dicafeoylglucaric isomer ^B	(Maas et al., 2009; Ruiz et al., 2013)	HCA
31	20.6	329	[C ₁₅ H ₁₃ O ₁₀]	353.0519	191.0197; 135.0452; 161.0244; 179.0350; 147.0299	-1.4	caffeoylisocitric acid isomer ^B	(Steingass et al., 2017)	HCA
32	20.6	328	[C ₁₈ H ₁₇ O ₈]	337.093	191.0561; 173.0455; 173.0397; 163.0401	-0.2	coumaroylquinic acid isomer ^B	(Steingass et al., 2017)	HCA
33	20.9	329	[C ₁₅ H ₁₃ O ₁₀]	353.0513	191.0197; 147.0299; 135.0452; 179.0350	0.4	caffeoylisocitric acid isomer ^B	(Steingass et al., 2017)	HCA
34	23.6	330	[C ₁₅ H ₁₃ O ₁₀]	353.0513	135.0452; 161.0244; 179.0350; 147.0299	0.4	caffeoylisocitric acid isomer ^B	(Steingass et al., 2017)	HCA
35	21.3	323	[C ₂₈ H ₃₅ O ₁₁]	523.2171	361.1657; 346.1422	2.6	mascaroside ^B	(Ducruix et al., 1977)	Monoterpenoid

[Escriba aquí]

36	21.5	323	[C ₁₅ H ₁₃ O ₆]	337.0560	163.0401	1.6	coumaroylisocitric acid isomer ^B	(Steingass et al., 2017)	HCA
37	22.1	235	[C ₁₇ H ₁₉ O ₆]	367.1030	191.0561; 134.0373	1.1	feruloylquinic acid isomer ^B	(Ruan et al., 2019)	HCA
38	22.2	323	[C ₂₁ H ₂₁ O ₁₂]	465.1067	285.0405	-1.1	plantagoside ^B	(Matsuura et al., 2014; Nie et al., 2021; Wang et al., 2016)	Flavonoid
39	22.3	323	[C ₁₃ H ₉ O ₁₅]	433.2072	161.0455; 179.0350	1.7	propanedioic acid, [5-[[2-[(6-deoxy- α -L-galactopyranosyl)oxy] cyclohexyl] oxy]-Pentyl] ^B	(Cabañas-García et al., 2019; Nova-Baza et al., 2022)	Benzoic acid
40	22.5	335	[C ₂₄ H ₂₁ O ₁₄]	533.0936	209.0303; 371.0620; 191.0139; 191.0197; 135.0452	0.2	dicafeoylglucaric acid isomer ^B	(Maas et al., 2009; Ruiz et al., 2013)	HCA
41	22.7	346	[C ₂₇ H ₂₉ O ₁₆]	609.1448	301.0354; 255.0299; 151.0037; 178.9986	2.1	quercetin-3-rutinoside ^A	(Ćirić et al., 2012; Olivares-Caro et al., 2020)	Flavonoid
42	22.9	326	[C ₂₄ H ₂₁ O ₁₄]	533.0930	209.0303; 191.0197; 191.0561	1.3	dicafeoylglucaric acid isomer ^B	(Maas et al., 2009; Ruiz et al., 2013)	HCA
43	23.4	327	[C ₁₈ H ₁₇ O ₈]	337.0220	191.0561	2.1	coumaroylquinic acid isomer ^B	(Steingass et al., 2017)	HCA
44	23.7	327	[C ₂₄ H ₂₁ O ₁₄]	533.0940	209.0303; 371.0620; 191.0197	-0.7	dicafeoylglucaric acid isomer ^B	(Maas et al., 2009; Ruiz et al., 2013)	HCA
[Escriba aquí]									
45	24.2	323	[C ₁₅ H ₁₃ O ₁₀]	515.0831	191.0197; 353.0514; 161.0244; 179.0350	1.3	dicafeoylisocitric acid isomer ^B	(Maas et al., 2009; Ruiz et al., 2013)	HCA
46	24.7		[C ₁₈ H ₁₅ O ₈]	335.0768	161.0244; 179.0350	1.2	caffeoylshikimic acid isomer ^B	(Elsadig Karar & Kuhnert, 2016)	HCA
47	24.8	349	[C ₂₁ H ₁₉ O ₁₂]	463.0874	271.0248; 301.0354; 255.0299	1.7	quercetin-3-D-galactoside ^A	(Chamorro et al., 2019; Olivares-Caro et al., 2020; Ruiz, Zapata, et al., 2014)	Flavonoid
48	25.1	349	[C ₂₁ H ₁₉ O ₁₂]	463.0872	271.0248; 301.0354; 255.0299	2.2	quercetin-3-glucoside ^A	(Chamorro et al., 2019; Olivares-Caro et al., 2020; Ruiz, Zapata, et al., 2014)	Flavonoid
49	25.2	338	[C ₂₁ H ₁₉ O ₁₁]	447.0933	284.0336	0	Kaempferol 7-O-glucoside ^B	(Elsadig Karar & Kuhnert, 2016)	Flavonoid
50	25.4	327	[C ₂₄ H ₂₁ O ₁₄]	533.0937	209.0303; 371.0561; 371.0620; 191.0197; 179.0350	0	dicafeoylglucaric acid isomer ^B	(Maas et al., 2009; Ruiz et al., 2013)	HCA
51	25.6	330	[C ₂₇ H ₂₉ O ₁₆]	593.1509	285.0405; 257.0455	0.4	Kaempferol rhamnosylhexoside ^B	(Elsadig Karar & Kuhnert, 2016)	Flavonoid
52	26	344	[C ₂₈ H ₃₁ O ₁₆]	623.1613	315.0510; 300.0276	0.7	isorhamnetin-rutinoside ^B	(Elsadig Karar & Kuhnert, 2016; Z. H. Li et al., 2016; Olivares-Caro et al., 2020)	Flavonoid

[Escriba aquí]

53	26.8	345	[C ₂₄ H ₂₁ O ₁₅]	549.0879	271.0248; 255.0299; 151.0037; 463.0882	1.3	quercetin-malonylglucoside isomer ^B	(Olivares-Caro et al., 2020; Ruiz, Mardones, et al., 2014)	Flavonoid
54	26.8	345	[C ₂₃ H ₂₁ O ₉]	505.0979	255.0299; 313.0354; 313.0412; 107.0350	1.8	unidentified		
55	27.1	345	[C ₂₄ H ₂₁ O ₁₅]	549.0886	271.0248; 301.0354; 255.0299	-0.1	quercetin -malonylglucoside isomer ^B	(Olivares-Caro et al., 2020; Ruiz, Mardones, et al., 2014)	Flavonoid
56	27.1	342	[C ₂₃ H ₂₁ O ₉]	505.0979	335.0409; 173.0092; 447.0933; 291.0510	0.9	unidentified		
57	27.2	332	[C ₂₁ H ₁₉ O ₁₁]	447.0925	255.0287; 227.0347; 447.0926; 284.0339	1.7	kaempferol-hexoside isomer ^B	(Elsadig Karar & Kuhnert, 2016)	Flavonoid
58	27.2	335	[C ₂₄ H ₂₁ O ₁₅]	579.2074	181.0506; 166.0272	1.6	syringaresinol hexoside isomer ^B	(Steingass et al., 2015)	Lignan
59	27.9	335	[C ₂₂ H ₂₁ O ₁₂]	477.1038	243.0299; 271.0248; 257.0455; 300.0276	0.1	isorhamnetin-glucoside isomer ^B	(Chamorro et al., 2019; Elsadig Karar & Kuhnert, 2016; Olivares- Caro et al., 2020)	Flavonoid
60	28.1	332	[C ₂₁ H ₁₉ O ₁₁]	447.0934	227.0355; 447.0923; 255.0305; 284.0337	-0.3	kaempferol-hexoside isomer ^B	(Elsadig Karar & Kuhnert, 2016)	Flavonoid

[Escriba aqui]

61	28.3	335	[C ₂₂ H ₂₁ O ₁₂]	477.1030	243.0299; 271.0248; 257.0455; 300.0276	1.8	isorhamnetin-galactoside isomer ^B	(Chamorro et al., 2019; Elsadig Karar & Kuhnert, 2016; Olivares- Caro et al., 2020)	Flavonoid
62	28.6	-	[C ₂₁ H ₁₉ O ₁₁]	447.0930	271.0248; 301.0354; 255.0299; 151.0037	0.7	quercetin-3-rhamnoside ^A	(Ćirić et al., 2012)	Flavonoid
63	28.9	327	[C ₂₃ H ₂₃ O ₁₂]	515.1189	353.0878; 191.0561; 179.0350; 135.0452; 161.0244	1.2	1,5 - dicaffeoylquinic acid ^A	(Olivares-Caro et al., 2020; Ruiz et al., 2013)	HCA
64	28.9		[C ₂₄ H ₂₅ O ₁₄]	537.1010	201.0193; 135.0452	5.3	limocitrol-hexoside isomer ^B	(El-Sayed et al., 2017; Rodríguez- Rivera et al., 2014)	Flavonoid
65	28.9	327	[C ₂₁ H ₁₉ O ₁₁]	431.0964	268.0377	4.5	apigenin-hexoside isomer ^B	(Elsadig Karar & Kuhnert, 2016)	Flavonoid
66	29.2	-	[C ₂₁ H ₁₉ O ₁₁]	447.0925	285.0405; 151.0037	1.7	kaempferol-hexoside isomer ^B	(Elsadig Karar & Kuhnert, 2016)	Flavonoid
67	29.2	-	[C ₂₀ H ₃₁ O ₉]	417.2121	371.2075; 161.0455; 101.0244	2.1	unidentified		
68	29.6	328	[C ₂₁ H ₁₉ O ₁₀]	431.0986	268.0360; 431.0938	-0.5	apigenin-hexoside isomer ^B	(Elsadig Karar & Kuhnert, 2016)	Flavonoid
69	29.6	328	[C ₂₄ H ₁₉ O ₃]	451.1027	341.0667; 109.0295	1.7	cinchonain 1a isomer ^B	(Beltrame et al., 2006; S. D. Chen et al., 2014; Elsadig Karar & Kuhnert, 2016)	Flavonoid

[Escriba aqui]

70	29.8	327	[C ₂₅ H ₂₃ O ₁₂]	515.1183	353.0878; 173.0455; 179.0350; 191.0452	2.4	4,5 - dicaffeoylquinic acid ^A	(Olivares-Caro et al., 2020; Ruiz et al., 2013)	HCA
71	29.9		[C ₂₄ H ₂₃ O ₁₄]	537.1021	201.0193; 375.0722	3.3	limocitrol-hexoside isomer ^B	(El-Sayed et al., 2017; Rodríguez-Rivera et al., 2014)	Flavonoid
72	30	328	[C ₂₄ H ₁₉ O ₉]	451.1035	341.0667; 109.0295	0	cinchonain 1a isomer ^B	(Beltrame et al., 2006; S. D. Chen et al., 2014; Elsadig Karar & Kuhnert, 2016)	Flavonoid
73	30.2	329	[C ₂₄ H ₂₃ O ₁₃]	519.1130	300.0276; 271.0248; 321.0405; 321.0463; 255.0299;	2.7	unidentified		
74	30.4	-	[C ₂₁ H ₁₉ O ₁₁]	447.0931	285.0405; 151.0037	0.3	kaempferol-hexoside isomer ^B	(Elsadig Karar & Kuhnert, 2016)	Flavonoid
75	30.4	328	[C ₂₄ H ₁₉ O ₉]	451.1037	341.0667; 109.0295	0.6	cinchonain 1a isomer ^B	(Beltrame et al., 2006; S. D. Chen et al., 2014; Elsadig Karar & Kuhnert, 2016)	Flavonoid
76	30.6	329	[C ₂₄ H ₂₃ O ₁₃]	519.1139	271.0248; 271.0307; 243.0299; 243.0358	1.1	unidentified		

t_R = retention time (min); λ nm = wavelength (nm). Ionic fragments are ordered according to their intensity from highest to lowest.

[Escriba aquí]

^A Identification level A: Standard or NMR, according to Alseekh et al., 2021 (Alseekh et al., 2021)(Alseekh et al., 2021).

^B Identification level B: Confident match based on MS/MS, or confident match using in-silico MS/MS approaches, or partial match based on MS/MS, according to Alseekh et al., 2021 (Alseekh et al., 2021)(Alseekh et al., 2021).

^C References are fully cited in Supplementary Materials.

[Escriba aquí]

317

318 These results are in agreement with the compounds identified in the methanolic extracts of leaves
319 from different *Berberis* genus (Nova-Baza et al., 2022), despite the differences between the
320 extraction procedures. Nevertheless, some of the HCAs, flavonoids, and benzoic acids identified
321 in the methanolic extract were not detected in the aqueous infusion. This dissimilarity can be
322 attributed to the different polarities and energies used for the extractions (methanol/ultrasound vs
323 water/temperature). Another difference between the infusion and the reported methanolic extract
324 is the presence of feruloylquinic acid isomers (EIC 367.1030 m/z) of higher polarity in the former,
325 probably due to the favoring of isomerization towards more polar isomers in water. The same was
326 observed for caffeoylquinic acid isomers (Supplementary Figure 1).

327

328 **3.2. Concentration of the main compounds in CI**

329 3.2.1. HCAs and flavonols

330 Figure 2b shows the chromatogram profile of the CI at 320 nm. The main signal of the
331 chromatogram was identified as 3-caffeoylquinic acid (3-CQ), according to the retention time and
332 the MS/MS spectra of the standard. The chromatogram shows that the HCAs profile is very
333 conserved with respect to that previously observed in Calafate fruit, in which 3-CQ was the most
334 important (Ruiz et al., 2013). **Table 2** summarizes the concentration of the main HCAs and flavonols
335 in the infusion (the figures of merit of the validation of the HCAs and flavonols quantification
336 methods are summarized in **Table 1S**). The highest concentration was observed for 3-CQ, followed
337 by caffeoylglucarics and some caffeoylisocitric isomers. The total concentration of HCAs was 2.5
338 mmol/L, expressed as 3-CQ. The concentrations of flavonols are much lower in CI. Quercetin-3-
339 galactoside and quercetin-3-glucoside were the main quantifiable flavonols, with a total
340 concentration of less than 15 μ mol/L. Considering a cup of infusion of 200 mL, the intake of HCAs
341 would be 160.8 mg per cup. The CI has a higher concentration of HCAs than 89 other herbal

[Escriba aquí]

342 infusions, including *Ilex paraguariensis* (Yerba mate), which is the infusion with the highest amount
 343 of HCAs (105,2 mg per cup) according to Dillenburg Meinhart et al., 2018 (Clifford, 1999; Meinhart
 344 et al., 2018). This interesting result strongly supports the idea of considering CI as a functional
 345 beverage.

346

347 **Table 2.** Concentration of the main HCAs and flavonols in CI (n=3)

t_R (min)	Identification by QTOF	Concentration $\mu\text{mol/L}$
11.3	3-or-4-transcaffeoylglucaric acid	204.99 \pm 11.34
12.1	3-or-4-transcaffeoylglucaric acid	339.19 \pm 21.41
12.8	2-or-5-transcaffeoylglucaric acid	132.85 \pm 8.95
13.5	5-caffeoylquinic acid	45.44 \pm 2.01
14.1	2-or-5-transcaffeoylglucaric acid	109.09 \pm 7.60
15.0	caffeoylisocitric acid isomer	179.09 \pm 12.50
16.0	3-caffeoylquinic acid	996.23 \pm 62.58
16.6	caffeoylisocitric acid isomer	173.10 \pm 16.84
17.6	caffeoylisocitric acid isomer	37.95 \pm 0.35
18.5	dicaffeoylglucaric isomerB	52.90 \pm 0.26
20.4	dicaffeoylglucaric isomerB	58.75 \pm 7.35
28.9	1,5 - dicaffeoylquinic acid	77.68 \pm 3.64
29.8	4,5-dicaffeoylquinic acid	138.05 \pm 7.62
24.8	quercetin-3-D-galactoside	6.38 \pm 4.13
25.1	quercetin-3-glucoside	7.48 \pm 3.86
Total HCAs		2497.85 \pm 189.05
Total Flavonols		13.86 \pm 7.99

348 Data are presented as mean \pm standard error.

[Escriba aquí]

349

350 3.2.1. Berberine

351 The figures of merit of the quantitative method for berberine are presented in **Table 1S**. The
352 concentration of berberine was 7.03 ± 2.24 mg/L in the CI obtained after 15 min of extraction (n=4).
353 Traces of Jatrorrhizine were also detected (data not shown). The identification of berberine and
354 Jatrorrhizine, as well as the absence of other alkaloids in the CI was confirmed by MS/MS.
355 Berberine has been assessed as a treatment for type 2 diabetes (Y. Zhang et al., 2008) due to its
356 ability to improve systemic insulin sensitivity through an increased AMPK activity, and also by
357 regulating gut microbiota (Han et al., 2011), among other mechanisms. Recently it has been
358 suggested that berberine reduces the intestinal absorption of glucose by inhibiting the IGF-1R-
359 PLC-beta 2-GLUT2 signal pathway (M. Zhang et al., 2022). Therefore, berberine could contribute
360 to reduce blood glucose levels after the consumption of the CI, acting as a functional beverage. On
361 the other hand, there is important evidence suggesting that berberine may be beneficial in the
362 context of Alzheimer's disease, by limiting the pathogenesis of extracellular amyloid plaques and
363 intracellular neurofibrillary tangles, and also by protective mechanisms against atherosclerosis
364 related to lipid and glucose lowering that slow oxidative stress and neuroinflammation (Cai et al.,
365 2016).

366

367 3.2.2. Elements

368 The analysis by TXRF using Ga as IS showed that the main elements in the CI were K, Ca, Cl, P,
369 and S (**Table 3**). The concentration of elements that play important roles in the regulation of
370 oxidative stress, such as Zn, Cu, and Mn, was lower than that described for other herbals infusions
371 (Tokalioğlu, 2012). However, these elements are important for the antioxidant potential of the
372 infusion, due to their interaction with several enzymes, e.g. Mn is a cofactor of superoxide
373 dismutase (SOD) (Fukai & Ushio-Fukai, 2011). Toxic metals as Hg, Se, and As were not detected

[Escriba aquí]

374 in the infusion, and Pb levels were lower than the maximum limit allowed in food (0.1 mg Kg⁻¹)
375 (Minsal, 2018). Thus, CI provides essential elements that contribute to human nutrition and
376 antioxidant response, and does not contain toxic elements.

377

378 **Table 3:** Estimated concentration of metals in the CI by TXRF

Element	Concentration mg/L
Aluminium	ND
Phosphorus	54.13 ± 2.35
Sulfur	36.27 ± 2.37
Chlorine	66.77 ± 1.71
Potassium	138.70 ± 2.31
Calcium	88.63 ± 4.20
Manganese	0.56 ± 0.04
Iron	0.41 ± 0.13
Cobalt	ND
Nickel	0.003 ± 0.00
Copper	0.02 ± 0.00
Zinc	0.09 ± 0.00
Lead*	0.01 ± 0.00

379 Data are presented as mean ± standard error. ND: not detected. *Pb: 0.08 expressed as mg Kg⁻¹.

380

381 3.3. Antioxidant capacity of the CI

382 The infusions prepared for 5, 10, and 15 min were used to evaluate the antioxidant capacity and
383 total polyphenol content of the CI (Table 4). These assays allow to get a global view of the
384 antioxidant potential of this new functional beverage.

385 High antioxidant capacity was obtained using three *in vitro* assays. The results showed no
386 significant differences between extraction times. The compounds with the highest concentrations
[Escriba aquí]

387 in the CI were HCAs, which could explain the high antioxidant capacity detected. HCAs have a
 388 rapid diffusion to the boiling water due to their high polarity. Moreover, a cup of CI (200 mL) has an
 389 ORAC of 2787.89 ± 84.37 TEAC μmol , which is higher than other commonly consumed beverages,
 390 such as coffee (1401.00 ± 2.49 TEAC μmol) (Ormaza et al., 2018) and yerba mate ($1775.00 \pm$
 391 210.72 TEAC μmol) (Mesquita et al., 2021). Based on these results, it is possible to consider this
 392 beverage as a promising potential functional drink.

393

394 **Table 4:** Antioxidant capacity of the CI

CI (min)	Folin-cicalteau	CUPRAC	ABTS	ORAC
	GAE $\mu\text{mol/L}$		TEAC $\mu\text{mol/L}$	
5'	1373.2 ± 226.9	18809.7 ± 4106.6	6651.3 ± 729.7	13456.4 ± 726.4
10'	1480.5 ± 335.1	20114.3 ± 3770.1	7890.8 ± 1243.5	14126.4 ± 1080.8
15'	1527.3 ± 231.6	18477.4 ± 3167.1	8491.6 ± 893.4	14235.6 ± 337.5

395 Data are presented as mean \pm standard error. Figures of merit are presented in Table 1S. GAE: gallic acid
 396 equivalent; TEAC: Trolox equivalent antioxidant capacity. N=3, statistical significance by ANOVA.

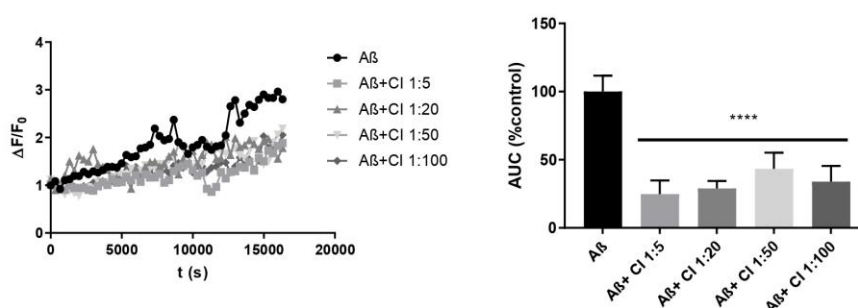
397

398 3.3.1. Effect of CI on A β aggregation assay: potential effect on Alzheimer's disease

399 The cytotoxicity of A β peptide is closely related to its state of aggregation (Fuentesalba et al., 2012).
 400 To evaluate the direct effect of the CI on the aggregation process of A β peptide, different dilutions
 401 of the aqueous infusion were studied. The kinetics of the Thioflavine T assay showed that its
 402 insertion into the β -sheet structure of A β decreases in the presence of CI, (**Figure 3**). Therefore,
 403 our results suggest that the CI could help to decrease the formation of A β aggregates, and reduce
 404 their cytotoxicity. In addition, these results represent an important advance for the development of
 405 functional foods that promote health and prevent the onset and progression of neurodegenerative
 406 disorders like Alzheimer's disease. The question that arises is whether the compounds present in
 407 the CI effectively reach therapeutic concentrations in the brain to show such effects. Even though

[Escriba aquí]

408 HCAs have been proved to be potent neuroprotective agents, they have a low lipophilicity due to
 409 the presence of a high number of OH groups, so they may not be able to penetrate the blood–brain
 410 barrier (Maruta et al., 1995). Furthermore, the metabolites produced after the ingestion of HCAs
 411 are even more polar, such as derivatives of 3-phenylpropionic acid, phenylacetic acid, benzoic acid,
 412 among others (Bustamante et al., 2018). It is for this reason that, despite our promising results, it
 413 is essential to continue this study with *in vivo* assays.



414
 415 **Figure 3:** Thioflavine T assay for the study of Aβ peptide aggregation. a) Kinetic aggregation of Aβ
 416 peptide in the presence of different CI dilutions; b) Area under the curve (AUC) of the kinetic
 417 aggregation of Aβ peptide. Incubation with 20 μM of Thioflavin T. CI: Calafate infusion at 1:100;
 418 1:50; 1:20 and 1:5 dilutions. Fluorescence intensity was determined as a percentage of the control
 419 signal (100%). Data are presented as mean ± standard error (n=6; ANOVA test with Bonferroni
 420 post hoc test; ****p<0.0001 vs control).

421

422 3.4. Evaluation of the cytotoxicity of CI

423 Two cell line models were used to evaluate the cytotoxicity of the Calafate aqueous infusion:
 424 HUVEC and PC12. The HUVEC viability experiment (**Figure 4a**) showed that only the less diluted
 425 infusion 1:3 (3.33 g DW/L of CI) affected cell viability after 24 h of incubation (p < 0.05). The positive
 426 control, i.e. cell lysis by serum deprivation after 48 h, showed a significant reduction in cell viability,
 427 of approximately 96%. This indicates that CI does not generate cytotoxicity at plasmatic levels

[Escriba aquí]

428 considering polyphenols concentration described in plasma (Bustamante et al., 2018). In PC12,
429 the dilutions of 1:100 and 1:50 were not cytotoxic, however, higher concentrations of CI reduced
430 cell viability by 20% (dilution of 1:20) and 30% (dilution of 1:5) with respect to the control. The
431 dilution of 1:5 (2 g DW/L of CI) showed the same cytotoxicity than FCCP (**Figure 4b**).

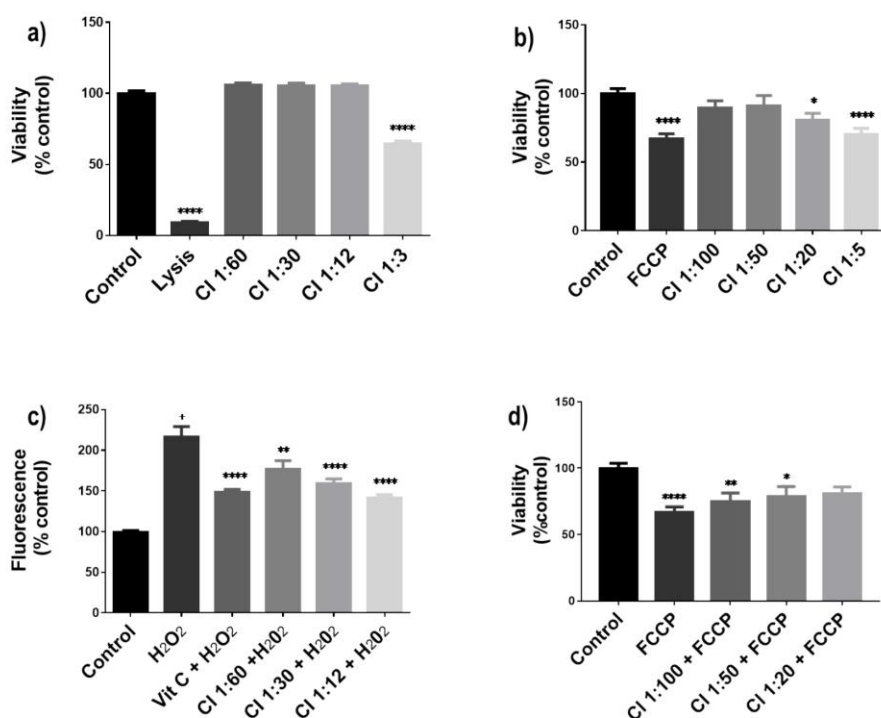
432

433 **3.5. Effect of CI on ROS production: potential protection against oxidative stress**

434 The potential of CI to prevent oxidative stress was assayed by evaluating its effect on intracellular
435 ROS production, by exposing HUVEC cells to H₂O₂ according to Olivares-Caro et al., (2020). The
436 ability of the infusion to prevent ROS production was determined with the H₂DCF-DA probe. The
437 results showed that 200 μM of H₂O₂ induced an increase of ROS to 215.99%, in comparison to
438 nontreated cells (negative control) ($p < 0.05$) (**Figure 4c**). The addition of vitamin C together with
439 H₂O₂ partially restored the radical production, by decreasing ROS production to 148.42%. Different
440 dilutions of the CI prevented ROS formation at a similar magnitude as vitamin C, with ROS levels
441 ranging from 176.85% (0.16 g/L) to 141.26 % (0.83 g/L).

442

[Escriba aquí]



443

444 **Figure 4:** *In vitro* viability and protective effect of Calafate infusion on HUVEC and PC12 cell line
 445 models. a) *In vitro* viability assay (MTT method) for HUVEC. Data are expressed as % with respect
 446 to the control, n=3. b) *In vitro* viability assay (MTT method) for PC12. Data are expressed as % with
 447 respect to the control, n=6. c) Protective effect of Calafate infusion against H₂O₂-induced reactive
 448 oxygen species (ROS) production in HUVEC cells. Intracellular ROS levels were determined by
 449 H₂DCF-DA fluorescence (10 μM, λ_{ex} 485 nm, λ_{em} 540 nm) in cells previously incubated with the
 450 infusion and then exposed to H₂O₂. Vitamin C (250 μg/mL) was used as the antioxidant control,
 451 n=3. H₂O₂ control (positive control). d) Protective effect of Calafate infusion against FCCP-induced
 452 oxidative stress in PC12 cells. The use of FCCP represents a mitochondrial oxidative
 453 phosphorylation model. The viability was determined as described in b). Non-statistically significant
 454 differences are observed between FCCP and CI 1:100 + FCCP and CI 1:50 + FCCP. Data are

[Escriba aquí]

455 presented as mean \pm standard error. ANOVA test and Bonferroni post hoc test were * $p < 0.05$ vs
456 control, ** $p < 0.01$ vs control, *** $p < 0.001$ vs control, **** $p < 0.0001$ vs control, + positive control..

457

458

459 Despite the protective effect of all the dilutions tested in HUVEC cells, the CI showed a
460 concentration-dependent behavior in PC12 cells. While the cells treated with CI 1:100 and 1:50
461 showed no statistically significant differences when compared to those treated with FCCP, their
462 coincubation with CI 1:20 and FCCP increased the cell viability up to the negative control levels
463 (**Figure 4d**). These results suggest that the infusion would have a protective role against oxidative
464 stress in different cell types. Moreover, this role could be mediated by its antioxidative capacity and
465 its subsequent effect on mitochondrial oxidative function. For instance, it could be related to its
466 content of chlorogenic acid and derivatives as caffeic or quinic acid, which decrease the oxidative
467 stress generated by different stressors affecting mitochondrial function (Fuentelba et al., 2011;
468 Khailova et al., 2019; J. Li et al., 2017).

469

470 **3.6. Effect of CI on *in vitro* enzymatic activity: potential effect on metabolic** 471 **syndrome**

472 Evidence of the interactions between digestive enzymes and polyphenols has been widely reported
473 (Griffiths, 1986; Martinez-Gonzalez et al., 2017). In addition, plant infusions and teas, including
474 aqueous extracts from teas, can inhibit the activity of lipase, α -glucosidase, and α -amylase
475 (Sellami et al., 2017). We observed that CI strongly reduced the initial velocity of lipase, α -
476 glucosidase and α -amylase, and lipase at 65%, 52%, and 76%, respectively, in comparison to the
477 control without CI (**Table 5**).

478

479 **Table 5:** Enzymatic inhibition produced by the CI

480

[Escriba aquí]

481

Kinetic parameter	Lipase		α -amylase		α -glucosidase	
	Vi	Decrease Vi (%)	Vi	Decrease Vi (%)	Vi	Decrease Vi (%)
Control	0.0034 \pm 0.0002	-	0.0200 \pm 0.0012	-	0.0955 \pm 0.004	-
CI	0.0012 \pm 0.0003 ***	65	0.0048 \pm 0.0004 ***	76	0.0456 \pm 0.004 ***	52

482 Fit method: Ordinary least squares; Vi method: Extra sum-of-squares. F Test ($p < 0.05$). Data are presented as
 483 mean \pm standard error. Vi: initial velocity. *** $p < 0.001$.

484

485 These results can be explained by the presence of the different HCAs identified in the CI, as they
 486 have been reported to have inhibitory activity against lipases (Cha et al., 2012; Karamać &
 487 Amarowicz, 1996; Wojdyło, 2021), α -glucosidase and α -amylase (Dalar & Konczak, 2014; J. Q.
 488 Zhao et al., 2017). For example, Hu et al. (2015) demonstrated that caffeoylquinic acids
 489 competitively inhibit pancreatic lipase by binding to its catalytic site (Hu et al., 2015). On the other
 490 hand, (Miao & Xiang, 2020) reported that chlorogenic acids present a varying inhibition activity
 491 against α -amylase, which depends on their structures according to the following order:
 492 dicaffeoylquinic acid > caffeoylquinic acid > caffeic acid > feruloylquinic acid > dihydrocaffeic acid
 493 > p-coumaric acid > ferulic acid > quinic acid. In this list, the caffeoylquinic acids are the compounds
 494 with the most caffeoyl moieties, and therefore those with the most hydroxyl groups, which are key
 495 to the inhibition of α -amylase via the formation of hydrogen bonds (Ćorković et al., 2022). This can
 496 explain the high inhibition induced by CI against α -amylase, given its high concentration of
 497 caffeoylquinic acids (**Table 1**). Likewise, (Xiao et al., 2013) reported that chlorogenic acid (3-O-
 498 caffeoylquinic acid) and 5-O-caffeoylquinic acid strongly inhibit the activity of α -glucosidase, and
 499 that the cause of this inhibitory behavior is associated with the length of their alkyl chains (Xiao et
 500 al., 2013). Furthermore, it has been described that berberine inhibits α -amylase and α -glucosidase,
 501 and that this mechanism contributes to the antidiabetic effect of this alkaloid (J. Zhao et al., 2022).

[Escriba aquí]

502 Therefore, considering that the CI produces a great inhibition of digestive enzymes, it could be used
503 as a dietary complement to reduce the risk of metabolic diseases such as obesity and type 2
504 diabetes (Jawed et al., 2019).

505

506 **4. Conclusions**

507 A new bioactive Calafate leaves infusion was developed. With a few minutes of steeping with boiling
508 water, high levels of HCAs and flavonols, and low levels of berberine, are extracted from dry leaves.
509 The infusion showed higher antioxidant capacity and total polyphenol content than traditional
510 infusions, including yerba mate. Important metal micronutrients were found at low concentrations
511 in the infusion, with the absence of toxic metals. Moreover, the CI did not show cytotoxicity and
512 prevented cell oxidative stress at plasma concentration levels. Furthermore, it showed
513 hypoglycemic and hypolipidemic activity through to the inhibition of important digestive enzymes.
514 Even though the reduction of A β peptide aggregation *in vitro* suggests its potential use as a
515 functional food to promote brain health, and as a preventive or protective food against
516 neurodegenerative processes such as Alzheimer's disease, *in vivo* studies must be performed to
517 confirm this idea. In conclusion, the CI has great potential to be used as a new functional drink to
518 aid in the prevention and treatment of the most prevalent non-communicable diseases.

519

520 **Funding**

521 This research was supported by Agencia Nacional de Investigación y Desarrollo
522 (ANID)/FONDECYT 1191276, (ANID)/FONDECYT 1230625, (ANID)/FONDECYT 1209008
523 ANID/FONDEQUIP EQM- 170023, ANID/ Beca Doctorado Nacional
524 21171702.

525

526

[Escriba aquí]

527 **Appendix A. Supplementary Materials**

528

529 The following are available online at Supplementary Figure 1: Feruloylquinic and caffeoylquinic
530 isomers extracted with methanol vs Calafate infusion, Supplementary Table 1: Figure of merit of
531 the validation methods for quantitative analysis

532

533 **Author Contributions:** Conceptualization, C.M. methodology, C.M., L.B., D.M., A.V., F.S. J.F. and
534 D.N.; software, L.B., D.N. and L.O.; validation, D.N.; formal analysis, D.N. and L.O.; investigation,
535 C.M. L.B., J.F. and D.N.; resources, C.M. and J.F.; data curation, L.B.; writing original draft
536 preparation, D.N.; writing review and editing, C.M., C.V., J.F.; visualization, D.N. and C.M.;
537 supervision, C.M., L.B.; project administration, C.M.; funding acquisition, C.M. All authors have
538 read and agreed to the published version of the manuscript.

539

540

541

542 **References**

543 Alseekh, S., Aharoni, A., Brotman, Y., Contrepois, K., D'Auria, J., Ewald, J., C. Ewald, J., Fraser, P. D., Giavalisco,
544 P., Hall, R. D., Heinemann, M., Link, H., Luo, J., Neumann, S., Nielsen, J., Perez de Souza, L., Saito, K.,
545 Sauer, U., Schroeder, F. C., ... Fernie, A. R. (2021). Mass spectrometry-based metabolomics: a guide for
546 annotation, quantification and best reporting practices. *Nature Methods*, 18(7), 747–756.
547 <https://doi.org/10.1038/s41592-021-01197-1>

548 Bach-Faig, A., Berry, E. M., Lairon, D., Reguant, J., Trichopoulou, A., Dernini, S., Medina, F. X., Battino, M.,
549 Belahsen, R., Miranda, G., Serra-Majem, L., Aranceta, J., Atinmo, T., Barros, J. M., Benjelloun, S., Bertomeu-
550 Galindo, I., Burlingame, B., Caballero-Bartoli, M., Clapés-Badrinas, C., ... Padulosi, S. (2011). Mediterranean
551 diet pyramid today. Science and cultural updates. *Public Health Nutrition*, 14(12A), 2274–2284.
552 <https://doi.org/10.1017/S1368980011002515>

[Escriba aquí]

- 553 Beltrame, F. L., Filho, E. R., Barros, F. A. P., Cortez, D. A. G., & Cass, Q. B. (2006). A validated higher-performance
554 liquid chromatography method for quantification of cinchonain Ib in bark and phytopharmaceuticals of *Trichilia*
555 *catigua* used as Catuaba. *Journal of Chromatography A*, *1119*(1–2), 257–263.
556 <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2005.10.050>
- 557 Bustamante, L., Pastene, E., Duran-Sandoval, D., Vergara, C., Von Baer, D., & Mardones, C. (2018).
558 Pharmacokinetics of low molecular weight phenolic compounds in gerbil plasma after the consumption of
559 calafate berry (*Berberis microphylla*) extract. *Food Chemistry*, *268*(February), 347–354.
560 <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2018.06.048>
- 561 Bustamante, L., Sáez, V., Hinrichsen, P., Castro, M. H., Vergara, C., von Baer, D., & Mardones, C. (2017).
562 Differences in *Vvufgt* and *VvmybA1* Gene Expression Levels and Phenolic Composition in Table Grape (*Vitis*
563 *vinifera* L.) 'Red Globe' and Its Somaclonal Variant 'Pink Globe.' *Journal of Agricultural and Food Chemistry*,
564 *65*(13), 2793–2804. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.6b04817>
- 565 Bystrom, L. M., Lewis, B. A., Brown, D. L., Rodriguez, E., & Obendorf, R. L. (2008). Characterisation of phenolics by
566 LC–UV/Vis, LC–MS/MS and sugars by GC in *Melicoccus bijugatus* Jacq. 'Montgomery' fruits. *Food Chemistry*,
567 *111*(4), 1017–1024. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2008.04.058>
- 568 Cabañas-García, E., Areche, C., Jáuregui-Rincón, J., Cruz-Sosa, F., & Balch, E. P. M. (2019). Phytochemical
569 profiling of *coryphantha macromeris* (cactaceae) growing in greenhouse conditions using ultra-high-
570 performance liquid chromatography–tandem mass spectrometry. *Molecules*, *24*(4).
571 <https://doi.org/10.3390/molecules24040705>
- 572 Cai, Z., Wang, C., & Yang, W. (2016). Role of berberine in Alzheimer's disease. *Neuropsychiatric Disease*
573 *and Treatment*, *Volume 12*, 2509–2520. <https://doi.org/10.2147/NDT.S114846>
- 574 Castillo, C., Fernández-Mendivil, C., Buendía, I., Saavedra, P., Meza, C., Parra, N. C., Lopez, M. G., Toledo, J. R., &
575 Fuentealba, J. (2019). Neuroprotective effects of EpoL against oxidative stress induced by soluble oligomers
576 of A β peptide. *Redox Biology*, *24*(April), 101187. <https://doi.org/10.1016/j.redox.2019.101187>
- 577 Cepae, B. A. (1999). Selected Medicinal Plants. *World Health*, *3*, 390.
- 578 Cha, K. H., Song, D. G., Kim, S. M., & Pan, C. H. (2012). Inhibition of gastrointestinal lipolysis by green tea, coffee,
579 and gomchui (*Ligularia fischeri*) tea polyphenols during simulated digestion. *Journal of Agricultural and Food*
580 *Chemistry*, *60*(29), 7152–7157. <https://doi.org/10.1021/jf301047f>
- 581 Chamorro, M. F., Reiner, G., Theoduloz, C., Ladio, A., Schmeda-Hirschmann, G., Gómez-Alonso, S., & Jiménez-
582 Aspee, F. (2019). Polyphenol composition and (bio)activity of *Berberis* species and wild strawberry from the
583 Argentinean Patagonia. *Molecules*, *24*(18), 1–24. <https://doi.org/10.3390/molecules24183331>

[Escriba aquí]

584 Chen, S. D., Lu, C. J., & Zhao, R. Z. (2014). Qualitative and quantitative analysis of rhizoma smilacis glabrae by ultra
585 high performance liquid chromatography coupled with LTQ OrbitrapXL hybrid mass spectrometry. *Molecules*,
586 19(7), 10427–10439. <https://doi.org/10.3390/molecules190710427>

587 Chen, Z., Digiacomio, M., Tu, Y., Gu, Q., Wang, S., Yang, X., Chu, J., Chen, Q., Han, Y., Chen, J., Nesi, G., Sestito,
588 S., Macchia, M., Rapposelli, S., & Pi, R. (2017). Discovery of novel rivastigmine-hydroxycinnamic acid hybrids
589 as multi-targeted agents for Alzheimer's disease. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 125, 784–792.
590 <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2016.09.052>

591 Ćirić, A., Prosen, H., Jelikić-Stankov, M., & Durević, P. (2012). Evaluation of matrix effect in determination of some
592 bioflavonoids in food samples by LC-MS/MS method. *Talanta*, 99(December 2017), 780–790.
593 <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2012.07.025>

594 Clifford, M. N. (1999). Chlorogenic acids and other cinnamates—nature, occurrence and dietary burden. *Journal of the*
595 *Science of Food and Agriculture*, 79(3), 362–372. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1097-0010\(19990301\)79](https://doi.org/10.1002/(SICI)1097-0010(19990301)79)

596 Ćorković, I., Gašo-Sokač, D., Pichler, A., Šimunović, J., & Kopjar, M. (2022). Dietary Polyphenols as Natural
597 Inhibitors of α -Amylase and α -Glucosidase. In *Life* (Vol. 12, Issue 11). MDPI.
598 <https://doi.org/10.3390/life12111692>

599 da Costa, M. F., Galaverna, R. S., Pudenzi, M. A., Ruiz, A. L. T. G., de Carvalho, J. E., Eberlin, M. N., & Santos, C.
600 dos. (2016). Profiles of phenolic compounds by FT-ICR MS and antioxidative and antiproliferative activities of
601 *Stryphnodendron obovatum* Benth leaf extracts. *Analytical Methods*, 8(31), 6056–6063.
602 <https://doi.org/10.1039/C6AY01272H>

603 Dalar, A., & Konczak, I. (2014). *Cichorium intybus* from Eastern Anatolia: Phenolic composition, antioxidant and
604 enzyme inhibitory activities. *Industrial Crops and Products*, 60, 79–85.
605 <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2014.05.043>

606 Ducruix, A., Pascard, C., Hammonniere, M., & Poisson, J. (1977). The crystal and molecular structure of
607 mascaroside, a new bitter glycoside from coffee beans. *Acta Crystallographica Section B Structural*
608 *Crystallography and Crystal Chemistry*, 33(9), 2846–2850. <https://doi.org/10.1107/s0567740877009601>

609 Elsadiğ Karar, M. G., & Kuhnert, N. (2016). UPLC-ESI-Q-TOF-MS/MS Characterization of Phenolics from *Crataegus*
610 *monogyna* and *Crataegus laevigata* (Hawthorn) Leaves, Fruits and their Herbal Derived Drops (*Crataegutt*
611 *Tropfen*). *Journal of Chemical Biology & Therapeutics*, 01(02), 1–23. [https://doi.org/10.4172/2572-](https://doi.org/10.4172/2572-0406.1000102)
612 0406.1000102

[Escriba aquí]

613 El-Sayed, M. A., Al-Gendy, A. A., Hamdan, D. I., & El-Shazly, A. M. (2017). Phytoconstituents, LC-ESI-MS profile,
614 antioxidant and antimicrobial activities of citrus X limon L. Burm. F. cultivar variegated pink lemon. *Journal of*
615 *Pharmaceutical Sciences and Research*, 9(4), 375–391.

616 Fais, A., Era, B., Di Petrillo, A., Floris, S., Piano, D., Montoro, P., Tuberoso, C. I. G., Medda, R., & Pintus, F. (2018).
617 Selected Enzyme Inhibitory Effects of Euphorbia characias Extracts. *BioMed Research International*.
618 <https://doi.org/10.1155/2018/1219367>

619 Forman, H. J. (2021). Targeting oxidative stress in disease : promise and limitations of antioxidant therapy. *Nature*
620 *Reviews Drug Discovery*, 20(September). <https://doi.org/10.1038/s41573-021-00233-1>

621 Fuentealba, J., Dibarrat, A. J., Fuentes-Fuentes, M. C., Saez-Orellana, F., Quiñones, K., Guzmán, L., Perez, C.,
622 Becerra, J., & Aguayo, L. G. (2011). Synaptic failure and adenosine triphosphate imbalance induced by
623 amyloid- β aggregates are prevented by blueberry-enriched polyphenols extract. *Journal of Neuroscience*
624 *Research*, 89(9), 1499–1508. <https://doi.org/10.1002/jnr.22679>

625 Fuentealba, J., Dibarrat, A., Saez-Orellana, F., Fuentes-Fuentes, M. C., Oyanedel, C. N., Guzmán, J., Perez, C.,
626 Becerra, J., & Aguayo, L. G. (2012). Synaptic silencing and plasma membrane dyshomeostasis induced by
627 amyloid- β peptide are prevented by aristotelia chilensis enriched extract. *Journal of Alzheimer's Disease*,
628 31(4), 879–889. <https://doi.org/10.3233/JAD-2012-120229>

629 Fukai, T., & Ushio-Fukai, M. (2011). Superoxide dismutases: Role in redox signaling, vascular function, and
630 diseases. *Antioxidants and Redox Signaling*, 15(6), 1583–1606. <https://doi.org/10.1089/ars.2011.3999>

631 Griffiths, D. W. (1986). The Inhibition of Digestive Enzymes by Polyphenolic Compounds. In Intergovernmental Panel
632 on Climate Change (Ed.), *Climate Change 2013 - The Physical Science Basis* (pp. 509–516). Cambridge
633 University Press. https://doi.org/10.1007/978-1-4757-0022-0_29

634 Gu, D., Yang, Y., Hang, B., Lv, Q., & Aisa, H. A. (2015). Characterization and identification of the chemical
635 compositions in a traditional uighur medicine prescription yizhihao granule by LC-ESI-QTOF-MS. *Journal of*
636 *Liquid Chromatography and Related Technologies*, 38(2), 229–242.
637 <https://doi.org/10.1080/10826076.2014.903848>

638 Han, J., Lin, H., & Huang, W. (2011). Modulating gut microbiota as an anti-diabetic mechanism of berberine. *Medical*
639 *Science Monitor*, 17(7), RA164–RA167. <https://doi.org/10.12659/MSM.881842>

640 Hu, B., Cui, F., Yin, F., Zeng, X., Sun, Y., & Li, Y. (2015). Caffeoylquinic acids competitively inhibit pancreatic lipase
641 through binding to the catalytic triad. *International Journal of Biological Macromolecules*, 80, 529–535.
642 <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2015.07.031>

[Escriba aquí]

643 Jäger, S., Beffert, M., Hoppe, K., Nadberzny, D., Frank, B., & Scheffler, A. (2011). Preparation of herbal tea as
644 infusion or by maceration at room temperature using mistletoe tea as an example. *Scientia Pharmaceutica*,
645 79(1), 145–155. <https://doi.org/10.3797/scipharm.1006-06>

646 Jawed, A., Singh, G., Kohli, S., Sumera, A., Haque, S., Prasad, R., & Paul, D. (2019). South African Journal of
647 Botany Therapeutic role of lipases and lipase inhibitors derived from natural resources for remedies against
648 metabolic disorders and lifestyle diseases. *South African Journal of Botany*, 120, 25–32.
649 <https://doi.org/10.1016/j.sajb.2018.04.004>

650 Karamać, M., & Amarowicz, R. (1996). Inhibition of Pancreatic Lipase by Phenolic Acids - Examination in vitro.
651 *Zeitschrift Fur Naturforschung - Section C Journal of Biosciences*, 51(11–12), 903–906.
652 <https://doi.org/10.1515/znc-1996-11-1222>

653 Khailova, L. S., Firsov, A. M., Kotova, E. A., & Antonenko, Y. N. (2019). Interaction of potent mitochondrial
654 uncouplers with thiol-containing antioxidants. *Antioxidants*, 8(6). <https://doi.org/10.3390/antiox8060194>

655 Krzyzanowska-Kowalczyk, J., Pecio, Ł., Młodoch, J., Ludwiczuk, A., & Kowalczyk, M. (2018). Novel phenolic
656 constituents of pulmonaria officinalis L. Lc-ms/ms comparison of spring and autumn metabolite profiles.
657 *Molecules*, 23(9), 1–32. <https://doi.org/10.3390/molecules23092277>

658 Larrazábal-Fuentes, M. J., Fernández-Galleguillos, C., Palma-Ramírez, J., Romero-Parra, J., Sepúlveda, K.,
659 Galetovic, A., González, J., Paredes, A., Bórquez, J., Simirgiotis, M. J., & Echeverría, J. (2020). Chemical
660 Profiling, Antioxidant, Anticholinesterase, and Antiprotozoal Potentials of *Artemisia copa* Phil. (Asteraceae).
661 *Frontiers in Pharmacology*, 11(December), 1–13. <https://doi.org/10.3389/fphar.2020.594174>

662 Lee, C. W., Won, T. J., Kim, H. R., Lee, D., Hwang, K. W., & Park, S. Y. (2011). Protective effect of chlorogenic acid
663 against A β -induced neurotoxicity. *Biomolecules and Therapeutics*, 19(2), 181–186.
664 <https://doi.org/10.4062/biomolther.2011.19.2.181>

665 LeVine, Harry, et al. (1993). Thioflavine T interaction with synthetic Alzheimer's disease β -amyloid peptides:
666 Detection of amyloid aggregation in solution. *Protein Science*, 2(3), 404–410.

667 Li, J., He, D., Wang, B., Zhang, L., Li, K., Xie, Q., & Zheng, L. (2017). Synthesis of hydroxycinnamic acid derivatives
668 as mitochondria-targeted antioxidants and cytotoxic agents. *Acta Pharmaceutica Sinica B*, 7(1), 106–115.
669 <https://doi.org/10.1016/j.apsb.2016.05.002>

670 Li, S., Li, S. K., Gan, R. Y., Song, F. L., Kuang, L., & Li, H. Bin. (2013). Antioxidant capacities and total phenolic
671 contents of infusions from 223 medicinal plants. *Industrial Crops and Products*, 51, 289–298.
672 <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2013.09.017>

[Escriba aquí]

673 Li, Z. H., Guo, H., Xu, W. Bin, Ge, J., Li, X., Alimu, M., & He, D. J. (2016). Rapid Identification of Flavonoid
674 Constituents Directly from PTP1B Inhibitive Extract of Raspberry (*Rubus idaeus* L.) Leaves by HPLC-ESI-
675 QTOF-MS-MS. *Journal of Chromatographic Science*, 54(5), 805–810.
676 <https://doi.org/10.1093/chromsci/bmw016>

677 Maas, M., Petereit, F., & Hensel, A. (2009). Caffeic acid derivatives from *Eupatorium perfoliatum* L. *Molecules*, 14(1),
678 36–45. <https://doi.org/10.3390/molecules14010036>

679 Manosalva, L., Mutis, A., Díaz, J., Urzúa, A., Fajardo, V., & Quiroz, A. (2014). Identification of isoquinoline alkaloids
680 from *berberis microphylla* by HPLC ESI-MS/MS. *Boletín Latinoamericano y Del Caribe de Plantas Medicinales*
681 *y Aromaticas*, 13(4), 324–335.

682 Marticorena, C., & Rodríguez, R. (2003). *Flora de Chile Vol 2 (2)*. Universidad de Concepción.

683 Martínez-Gonzalez, A. I., Díaz-Sánchez, Á. G., De La Rosa, L. A., Vargas-Requena, C. L., Bustos-Jaimes, I., &
684 Alvarez-Parrilla, E. (2017). Polyphenolic compounds and digestive enzymes: In vitro non-covalent interactions.
685 *Molecules*, 22(4). <https://doi.org/10.3390/molecules22040669>

686 Maruta, Y., Kawabata, J., & Niki, R. (1995). Antioxidative Caffeoylquinic Acid Derivatives in the Roots of Burdock
687 (*Arctium lappa* L.). In *J. Agric. Food Chem* (Vol. 43).

688 Matsuura, N., Aradate, T., Kurosaka, C., Ubukata, M., Kittaka, S., Nakaminami, Y., Gamo, K., Kojima, H., & Ohara,
689 M. (2014). Potent protein glycation inhibition of plantagoside in *plantago major* seeds. *BioMed Research*
690 *International*, 2014, 1–5. <https://doi.org/10.1155/2014/208539>

691 Matthews, D. G., Caruso, M., Alcazar Magana, A., Wright, K. M., Maier, C. S., Stevens, J. F., Gray, N. E., Quinn, J.
692 F., & Soumyanath, A. (2020). Caffeoylquinic Acids in *Centella asiatica* Reverse Cognitive Deficits in Male
693 5XFAD Alzheimer's Disease Model Mice. *Nutrients*, 12(11), 3488. <https://doi.org/10.3390/nu12113488>

694 Meinhart, A. D., Caldeirão, L., Damin, F. M., Filho, J. T., & Godoy, H. T. (2018). Analysis of chlorogenic acids
695 isomers and caffeic acid in 89 herbal infusions (tea). *Journal of Food Composition and Analysis*, 73, 76–82.
696 <https://doi.org/10.1016/j.jfca.2018.08.001>

697 Mekky, R. H., Abdel-Sattar, E., Segura-Carretero, A., & Del Mar Contreras, M. (2019). Phenolic compounds from
698 sesame cake and antioxidant activity: A new insight for agri-food residues' significance for sustainable
699 development. *Foods*, 8(10). <https://doi.org/10.3390/foods8100432>

700 Mesquita, M., Santos, E., Kassuya, C. A., & Salvador, M. J. (2021). Chimarrão, terere and mate-tea in legitimate
701 technology modes of preparation and consume: A comparative study of chemical composition, antioxidant,
702 anti-inflammatory and anti-anxiety properties of the mostly consumed beverages of *Ilex paraguariensis* St. H.
703 *Journal of Ethnopharmacology*, 279(July), 114401. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2021.114401>

[Escriba aquí]

704 Miao, M., & Xiang, L. (2020). Pharmacological action and potential targets of chlorogenic acid. In *Advances in*
705 *Pharmacology* (Vol. 87, pp. 71–88). Academic Press Inc. <https://doi.org/10.1016/bs.apha.2019.12.002>

706 Minsal. (2018). Reglamento sanitario de los alimentos Decreto 977-96. *Reglamento Sanitario de Los Alimentos*, 11,
707 1–200.

708 Neri-Numa, I. A., Pessôa, M. G., Arruda, H. S., Pereira, G. A., Paulino, B. N., Angolini, C. F. F., Ruiz, A. L. T. G., &
709 Pastore, G. M. (2020). Genipap (Genipa americana L.) fruit extract as a source of antioxidant and
710 antiproliferative iridoids. *Food Research International*, 134, 109252.
711 <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2020.109252>

712 Nie, R., Zhang, Y., Jin, Q., Zhang, S., Wu, G., Chen, L., Zhang, H., & Wang, X. (2021). Identification and
713 characterisation of bioactive compounds from the seed kernels and hulls of *Paeonia lactiflora* Pall by UPLC-
714 QTOF-MS. *Food Research International*, 139(September 2020), 109916.
715 <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2020.109916>

716 Nova-Baza, D., Olivares-Caro, L., Bustamante, L., Pérez, A. J., Vergara, C., Fuentealba, J., & Mardones, C. (2022).
717 Metabolic profile and antioxidant capacity of five Berberis leaves species: A comprehensive study to determine
718 their potential as natural food or ingredient. *Food Research International*, 160, 111642.
719 <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2022.111642>

720 Olivares-Caro, L., Radojkovic, C., Chau, S. Y., Nova, D., Bustamante, L., Neira, J. Y., Perez, A. J., & Mardones, C.
721 (2020). Berberis microphylla G. Forst (Calafate) Berry Extract Reduces Oxidative Stress and Lipid
722 Peroxidation of Human LDL. *Antioxidants*, 9(12), 1171. <https://doi.org/10.3390/antiox9121171>

723 Ormazza, A. M., Díaz, F. O., & Rojano, B. A. (2018). Effect of coffee aging (coffea arabica l. Var. Castillo) on the
724 composition of total phenols, flavonoids, chlorogenic acid and antioxidant activity. *Informacion Tecnologica*,
725 29(3), 187–196. <https://doi.org/10.4067/S0718-07642018000300187>

726 Ou, B., Chang, T., Huang, D., & Prior, R. L. (2013). Determination of total antioxidant capacity by oxygen radical
727 absorbance capacity (ORAC) using fluorescein as the fluorescence probe: First action 2012.23. *Journal of*
728 *AOAC International*, 96(6), 1372–1376. <https://doi.org/10.5740/jaoacint.13-175>

729 Pagano, K., Tomaselli, S., Molinari, H., & Ragona, L. (2020). Natural Compounds as Inhibitors of A β Peptide
730 Aggregation: Chemical Requirements and Molecular Mechanisms. *Frontiers in Neuroscience*, 14(December),
731 1–18. <https://doi.org/10.3389/fnins.2020.619667>

732 Reyes-Farias, M., Vasquez, K., Fuentes, F., Ovalle-Marin, A., Parra-Ruiz, C., Zamora, O., Pino, M. T., Quiral, V.,
733 Jimenez, P., Garcia, L., & Garcia-Diaz, D. F. (2016). Extracts of Chilean native fruits inhibit oxidative stress,

[Escriba aquí]

734 inflammation and insulin-resistance linked to the pathogenic interaction between adipocytes and
735 macrophages. *Journal of Functional Foods*, 27, 69–83. <https://doi.org/10.1016/j.jff.2016.08.052>

736 Rodríguez-Rivera, M. P., Lugo-Cervantes, E., Winterhalter, P., & Jerz, G. (2014). Metabolite profiling of polyphenols
737 in peels of Citrus limetta Risso by combination of preparative high-speed countercurrent chromatography and
738 LC-ESI-MS/MS. *Food Chemistry*, 158, 139–152. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2014.02.077>

739 Roh, C., & Jung, U. (2012). Screening of crude plant extracts with anti-obesity activity. *International Journal of*
740 *Molecular Sciences*, 13(2), 1710–1719. <https://doi.org/10.3390/ijms13021710>

741 Ruan, J., Yan, J., Zheng, D., Sun, F., Wang, J., Han, L., Zhang, Y., & Wang, T. (2019). Comprehensive Chemical
742 Profiling in the Ethanol Extract of Pluchea indica Aerial Parts by Liquid Chromatography/Mass Spectrometry
743 Analysis of Its Silica Gel Column Chromatography Fractions. *Molecules*, 24(15).
744 <https://doi.org/10.3390/molecules24152784>

745 Ruiz, A., Hermosín-Gutiérrez, I., Mardones, C., Vergara, C., Herlitz, E., Vega, M., Dorau, C., Winterhalter, P., & von
746 Baer, D. (2010). Polyphenols and Antioxidant Activity of Calafate (Berberis microphylla) Fruits and Other
747 Native Berries from Southern Chile. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 58(10), 6081–6089.
748 <https://doi.org/10.1021/jf100173x>

749 Ruiz, A., Mardones, C., Vergara, C., Hermosín-Gutiérrez, I., von Baer, D., Hinrichsen, P., Rodríguez, R., Arribillaga,
750 D., & Domínguez, E. (2013). Analysis of hydroxycinnamic acids derivatives in calafate (Berberis microphylla G.
751 Forst) berries by liquid chromatography with photodiode array and mass spectrometry detection. *Journal of*
752 *Chromatography A*, 1281, 38–45. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2013.01.059>

753 Ruiz, A., Mardones, C., Vergara, C., Von Baer, D., Gómez-Alonso, S., Gómez, M. V., & Hermosín-Gutiérrez, I.
754 (2014). Isolation and structural elucidation of anthocyanidin 3,7-β-O- diglucosides and caffeoyl-glucaric acids
755 from calafate berries. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 62(29), 6918–6925.
756 <https://doi.org/10.1021/jf5012825>

757 Ruiz, A., Zapata, M., Sabando, C., Bustamante, L., von Baer, D., Vergara, C., & Mardones, C. (2014). Flavonols,
758 Alkaloids, and Antioxidant Capacity of Edible Wild Berberis Species from Patagonia. *Journal of Agricultural*
759 *and Food Chemistry*, 62(51), 12407–12417. <https://doi.org/10.1021/jf502929z>

760 Russo, G., Curcio, F., Bulli, G., Aran, L., Della-morte, D., Testa, G., Cacciatore, F., Bonaduce, D., & Abete, P.
761 (2018). *Oxidative stress , aging , and diseases*. 757–772.

762 Salehi, B., Selamoglu, Z., Sener, B., Kilic, M., Jugran, A. K., De Tommasi, N., Sinisgalli, C., Milella, L., Rajkovic, J.,
763 Morais-Braga, M. F. B., Bezerra, C. F., Rocha, J. E., Coutinho, H. D. M., Ademiluyi, A. O., Shinwari, Z. K., Jan,

[Escriba aquí]

764 S. A., Erol, E., Ali, Z., Ostrander, E. A., ... Cho, W. C. (2019). Berberis plants-drifting from farm to food
765 applications, phytotherapy, and phytopharmacology. *Foods*, 8(10). <https://doi.org/10.3390/foods8100522>

766 Sánchez Gutiérrez, R., & Guzmán Pincheira, C. (2021). Description of the antioxidant capacity of Calafate berries
767 (Berberis microphylla) collected in Southern Chile. *Food Science and Technology (Brazil)*, 41(4), 864–869.
768 <https://doi.org/10.1590/fst.25820>

769 Santana-Gálvez, J., Cisneros-Zevallos, L., & Jacobo-Velázquez, D. (2017). Chlorogenic Acid: Recent Advances on
770 Its Dual Role as a Food Additive and a Nutraceutical against Metabolic Syndrome. *Molecules*, 22(3), 358.
771 <https://doi.org/10.3390/molecules22030358>

772 Schmeda-Hirschmann, G., Jiménez-Aspee, F., Theoduloz, C., & Ladio, A. (2019). Patagonian berries as native food
773 and medicine. *Journal of Ethnopharmacology*, 241, 111979. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2019.111979>

774 Sellami, M., Louati, H., Kamoun, J., Kchaou, A., Damak, M., & Gargouri, Y. (2017). Inhibition of pancreatic lipase and
775 amylase by extracts of different spices and plants. *International Journal of Food Sciences and Nutrition*, 68(3),
776 313–320. <https://doi.org/10.1080/09637486.2016.1237479>

777 Steingass, C. B., Glock, M. P., Lieb, V. M., & Carle, R. (2017). Light-induced alterations of pineapple (*Ananas*
778 *comosus* [L.] Merr.) juice volatiles during accelerated ageing and mass spectrometric studies into their
779 precursors. *Food Research International*, 100(March), 366–374. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2017.06.030>

780 Steingass, C. B., Glock, M. P., Schweiggert, R. M., & Carle, R. (2015). Studies into the phenolic patterns of different
781 tissues of pineapple (*Ananas comosus* [L.] Merr.) infructescence by HPLC-DAD-ESI-MS n and GC-MS
782 analysis. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 407(21), 6463–6479. [https://doi.org/10.1007/s00216-015-](https://doi.org/10.1007/s00216-015-8811-2)
783 8811-2

784 Tokaloğlu, Ş. (2012). Determination of trace elements in commonly consumed medicinal herbs by ICP-MS and
785 multivariate analysis. *Food Chemistry*, 134(4), 2504–2508. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2012.04.093>

786 Valduga, A. T., Gonçalves, I. L., Magri, E., & Delalibera Finzer, J. R. (2019). Chemistry, pharmacology and new
787 trends in traditional functional and medicinal beverages. *Food Research International*, 120(October 2018),
788 478–503. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2018.10.091>

789 Wang, D., Qi, M., Yang, Q., Tong, R., Wang, R., Bligh, S. W. A., Yang, L., & Wang, Z. (2016). Comprehensive
790 metabolite profiling of Plantaginis Semen using ultra high performance liquid chromatography with
791 electrospray ionization quadrupole time-of-flight tandem mass spectrometry coupled with elevated energy
792 technique. *Journal of Separation Science*, 39(10), 1842–1852. <https://doi.org/10.1002/jssc.201501149>

[Escriba aquí]

793 Wojdylo, A. (2021). *Profile of Phenolic Compounds of Prunus armeniaca L . Leaf Extract Determined by LC-ESI-*
794 *QTOF-MS / MS and Their.*

795 Xiao, J., Kai, G., Yamamoto, K., & Chen, X. (2013). Advance in Dietary Polyphenols as α -Glucosidases Inhibitors: A
796 Review on Structure-Activity Relationship Aspect. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 53(8), 818–
797 836. <https://doi.org/10.1080/10408398.2011.561379>

798 Yang, L., Wang, N., & Zheng, G. (2018). Enhanced Effect of Combining Chlorogenic Acid on Selenium Nanoparticles
799 in Inhibiting Amyloid β Aggregation and Reactive Oxygen Species Formation In Vitro. *Nanoscale Research*
800 *Letters*, 13, 1–9. <https://doi.org/10.1186/s11671-018-2720-1>

801 Zhang, J., Wen, Q., Qian, K., Feng, Y., Luo, Y., & Tan, T. (2019). Metabolic profile of rosmarinic acid from Java tea
802 (Orthosiphon stamineus) by ultra-high-performance liquid chromatography coupled to quadrupole-time-of-flight
803 tandem mass spectrometry with a three-step data mining strategy. *Biomedical Chromatography*, 33(9), 1–9.
804 <https://doi.org/10.1002/bmc.4599>

805 Zhang, L., Hogan, S., Li, J., Sun, S., Canning, C., Zheng, S. J., & Zhou, K. (2011). Grape skin extract inhibits
806 mammalian intestinal α -glucosidase activity and suppresses postprandial glycemic response in streptozocin-
807 treated mice. *Food Chemistry*, 126(2), 466–471. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2010.11.016>

808 Zhang, M., Yang, H., Yang, E., Li, J., & Dong, L. (2022). Berberine Decreases Intestinal GLUT2 Translocation and
809 Reduces Intestinal Glucose Absorption in Mice. *International Journal of Molecular Sciences*, 23(1).
810 <https://doi.org/10.3390/ijms23010327>

811 Zhang, Y., Li, X., Zou, D., Liu, W., Yang, J., Zhu, N., Huo, L., Wang, M., Hong, J., Wu, P., Ren, G., & Ning, G. (2008).
812 Treatment of type 2 diabetes and dyslipidemia with the natural plant alkaloid berberine. *Journal of Clinical*
813 *Endocrinology and Metabolism*, 93(7), 2559–2565. <https://doi.org/10.1210/jc.2007-2404>

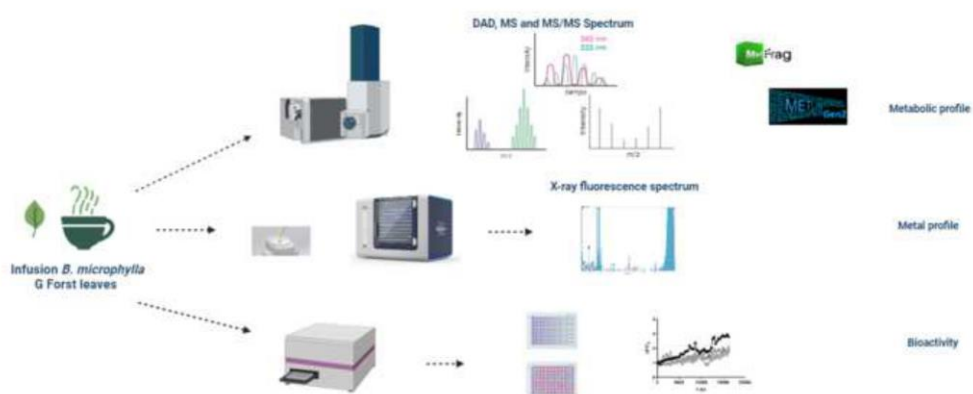
814 Zhang, Y., Xiong, H., Xu, X., Xue, X., Liu, M., Xu, S., Liu, H., Gao, Y., Zhang, H., & Li, X. (2018). Compounds
815 identification in semen cuscatae by ultra-high-performance liquid chromatography (uplcs) coupled to
816 electrospray ionization mass spectrometry. *Molecules*, 23(5). <https://doi.org/10.3390/molecules23051199>

817 Zhao, J. Q., Wang, Y. M., Yang, Y. L., Zeng, Y., Mei, L. J., Shi, Y. P., & Tao, Y. D. (2017). Antioxidants and α -
818 glucosidase inhibitors from "Liucha" (young leaves and shoots of *Sibiraea laevigata*). *Food Chemistry*, 230,
819 117–124. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2017.03.024>

820 Zhao, J., Wang, Z., Karrar, E., Xu, D., & Sun, X. (2022). Inhibition Mechanism of Berberine on α -Amylase and α -
821 Glucosidase in Vitro. *Starch/Staerke*, 74(3–4), 1–9. <https://doi.org/10.1002/star.202100231>

822

[Escriba aquí]



Declaration of Interest Statement

Declaration of interests

The authors declare that they have no known competing financial interests or personal relationships that could have appeared to influence the work reported in this paper.

The authors declare the following financial interests/personal relationships which may be considered as potential competing interests:

4.2 Objetivo 2 y 3

El siguiente trabajo resume los resultados obtenidos para cumplir con los objetivos 2 y 3 del trabajo doctoral.

Análisis preliminar del impacto de una dieta suplementada con extracto de Calafate y Ejercicio Aeróbico regular en el metaboloma de un modelo murino de estrés oxidativo

Resumen

El estrés oxidativo es resultado de un desequilibrio entre las moléculas prooxidantes y mecanismos antioxidantes presentes en el organismo. Este desequilibrio se produce por un aumento en la razón de radicales libres y otras moléculas altamente reactivas, como el peróxido de hidrógeno (H_2O_2) o el óxido nítrico (NO) versus los mecanismos antioxidantes presentes en el organismo.

Diversas patologías como la diabetes mellitus tipo II, enfermedades cardiovasculares, cáncer, enfermedades neurodegenerativas (como el Alzheimer, Parkinson y la esclerosis lateral amiotrófica) y enfermedades inflamatorias crónicas (como la artritis reumatoide, el asma y la enfermedad inflamatoria intestinal) comparten un nivel elevado de estrés oxidativo como factor común. En nuestro estudio, se propuso evaluar cómo los antioxidantes exógenos provenientes de un extracto de fruto de calafate rico en polifenoles y los antioxidantes endógenos inducidos por el ejercicio aeróbico regular, afectan el metabolismo en un modelo

murino de estrés oxidativo. El estudio se basó en el uso de ratones envejecidos. Para ello los animales se dividieron en cuatro grupos (Grupo control; Grupo con dieta suplementada con calafate; Grupo con ejercicio aeróbico regular y Grupo con dieta y ejercicio aeróbico regular). Realizando un análisis visual de los cromatogramas, y un análisis metabolómico no dirigido mediante UHPLC-QTOF-MS/MS con muestras de plasma, cerebro e hipocampo. Los resultados obtenidos permitieron identificar de manera preliminar 33 metabolitos asociados a estrés oxidativo, principalmente el ácido taurocólico, el cual se proponen como potencial biomarcador de oxidación.

4.2.1 **Introducción**

La producción de especies reactivas de oxígeno (ROS) y el estrés oxidativo han sido ampliamente estudiados en relación con diversas enfermedades metabólicas, cáncer y trastornos neurodegenerativos ¹⁰⁶. Cuando se produce un desequilibrio entre las moléculas prooxidantes y los mecanismos antioxidantes, las ROS pueden interactuar y oxidar biomoléculas como lípidos, proteínas y ácidos nucleicos, lo que puede alterar sus funciones celulares y contribuir al desarrollo de estas enfermedades ¹⁰⁷.

Los sistemas antioxidantes endógenos, como la enzima superóxido dismutasa (SOD), la catalasa y el glutatión, desempeñan un papel crucial en la neutralización de las ROS y el mantenimiento del equilibrio redox ^{108,109}. Los antioxidantes exógenos presentes en la dieta, como los polifenoles, taninos y vitaminas C y D contribuyen a la defensa contra el estrés oxidativo ^{110,111}. Entre estos antioxidantes exógenos, las frutas y verduras se destacan como las principales fuentes para el consumo humano.

Uno de los frutos que se caracteriza por su alto contenido de polifenoles, principalmente antocianinas, además de ácidos hidroxicinámicos y flavonoles, es el Calafate (*Berberis microphylla*), originario de la Patagonia chileno-argentina ¹¹², proveniente de un arbusto autóctono perenne que posee el mismo nombre. El calafate ha sido ampliamente estudiado debido a su alto contenido de polifenoles, principalmente antocianinas ^{33,112}, ácidos hidroxicinámicos (HCAs) y flavonoles ^{32,113}. Además, estudios identificaron y cuantificaron la presencia en bajas cantidades de berberina (32.7 ± 11.9 nmol/g de peso fresco) ¹¹³. La Berberina es un alcaloide que ha sido asociado como una alternativa en el tratamiento de enfermedades con altos índices de estrés oxidativo como Diabetes Mellitus tipo 2, dislipidemias, patologías renales entre otras ^{42,114,115}

En el estudio realizado por Olivares-Caro y colaboradores ¹⁰² se investigaron las propiedades de un extracto rico en polifenoles del fruto del calafate en modelos celulares. El objetivo principal de esta investigación fue identificar y analizar el papel conjunto de estos metabolitos secundarios en la protección contra niveles elevados de estrés oxidativo ¹⁰²

Los resultados del estudio in vitro demostraron que el extracto del fruto del calafate fue capaz de inhibir la producción de ROS en células HUVECs además de proteger a la lipoproteína de baja densidad (LDL, por sus siglas en inglés) de la oxidación. Este último efecto es de particular relevancia, ya que la oxidación de LDL está estrechamente relacionado al daño endotelial, factor principal en el desarrollo de la aterosclerosis ¹⁰²

Posteriormente, un estudio realizado por nuestro grupo de investigación ⁷⁶, se evaluó el efecto de la administración crónica de un extracto de fruto de calafate en un modelo murino sometido a una dieta alta en grasas (HFD, por sus siglas en inglés). Los resultados del estudio mostraron que el grupo que consumió calafate junto con una dieta alta en grasa disminuyó de manera significativa la expresión de proteínas inflamatorias, tales como la trombosudulina, sE-selectina, sICAM-1 y proMMP-9, todas ellas asociadas a disfunción endotelial. Esta reducción fue significativamente mayor en comparación con el grupo que mantenía una dieta alta en grasas, pero sin consumo del extracto de calafate ⁷⁶.

Por otro lado, se observó una disminución en los niveles de leptina y un incremento en adiponectina con respecto al grupo control ⁷⁶. Estos cambios en las concentraciones hormonales se asocian con una

disminución del riesgo de enfermedad cardiovascular. En este mismo estudio se detectaron diferencias significativas entre los grupos con relación a los metabolitos asociados a la β -oxidación de ácidos grasos, disfunción endotelial y estrés oxidativo tales como el ácido succínico, ácido deoxicólico y ácido aminoadípico ⁷⁶. Estos resultados sugieren que los polifenoles presente en la alimentación juega un rol importante en el combate del estrés oxidativo, que puede ser el punto de partida de diversos estados patológicos en el organismo.

Por otro lado, el ejercicio físico, a pesar de aumentar la producción de ROS debido al mayor consumo de oxígeno, ha demostrado tener efectos beneficiosos al activar mecanismos antioxidantes endógenos y adaptaciones en el organismo ^{108,116}. Los ROS generados durante el ejercicio actúan como moléculas señalizadoras, desempeñando un papel importante en las adaptaciones al estrés oxidativo ^{108,116,117}.

Mediante el análisis e identificación de metabolitos, la metabolómica nos brinda la capacidad de discernir patrones metabólicos únicos asociados con la dieta, el ejercicio y el estrés oxidativo ¹¹⁸ Esta disciplina analítica se basa en la detección y cuantificación de múltiples metabolitos (<1500 Da) presentes en una muestra biológica, lo que nos brinda una visión holística de los cambios metabólicos que ocurren en respuesta a las

intervenciones dietéticas y al ejercicio físico en un momento determinado ^{119,120}.

La espectrometría de masas de alta resolución acoplada a cromatografía líquida (UHPLC-QTOF-MS) y a herramientas metabolómicas asociadas nos permite analizar e identificar una amplia gama de metabolitos en muestras biológicas, que nos podría llevar a identificar biomarcadores potenciales relacionados con cambios metabólicos en profundidad ¹²¹. Así, podemos obtener una comprensión detallada de cómo la combinación de la dieta y el ejercicio afecta los perfiles metabólicos.

Con estos antecedentes, este estudio se centró en llevar a cabo una intervención nutricional basada en una dieta enriquecida con un extracto del fruto del Calafate, combinada con un programa regular de ejercicio aeróbico, con el fin de evaluar sus efectos sobre el estrés oxidativo en muestras de plasma, cerebro e hipocampo

Utilizando un modelo murino, se implementó un análisis integral basado en una estrategia de metabolómica no dirigida en esta fase preliminar del estudio. El propósito de esta investigación fue identificar posibles metabolitos relacionados con el estrés oxidativo en muestras biológicas de ratones, proporcionando así una base para futuras investigaciones.

Además, se llevó a cabo la caracterización del extracto del fruto de calafate, se evaluó su citotoxicidad in vitro utilizando células PC-12 y se estudió su impacto en la actividad neuronal aguda.

El objetivo de esta investigación es lograr una mejor comprensión de los efectos de los antioxidantes exógenos proveniente de la dieta, y el ejercicio físico regular sobre el estrés oxidativo. También se busca identificar posibles biomarcadores relacionados con el efecto protector del fruto del calafate y/o el ejercicio físico. Los hallazgos obtenidos en este estudio podrían tener implicaciones en el desarrollo de estrategias nutricionales y de ejercicio físico para contrarrestar el estrés oxidativo y promover la salud en general.

4.2.2 **Materiales y métodos**

4.2.2.1 Obtención de un extracto de calafate

La extracción de frutos de calafate se llevó a cabo como se describe en ³³, variando el solvente de extracción a etanol/ácido fórmico (97:3). Los compuestos polares y semipolares del extracto etanólico fueron analizados mediante HPLC-DAD-ESI-QTOF y posterior búsqueda en librerías espectrales. Antocianos y HCAs se cuantificaron mediante HPLC-DAD (a 540nm y 320 nm respectivamente) y los ácidos grasos se

cuantificaron mediante GC-MS. En la Tabla 4.1 se detallan las cuantificación de Antocianos, HCAs y ácidos grasos presentes en el extracto de fruto de calafate. Este extracto fue el mismo utilizado en el trabajo de Olivares y colaboradores ¹⁰²

Tabla 4.1 Composición de Antocianos, HCAs y ácidos grasos del extracto de calafate utilizado.

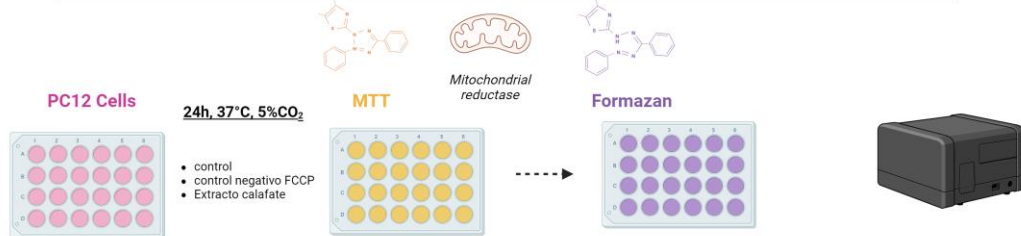
Extracto Calafate etanólico		
Antocianinas	2160 ± 70	mmol/mL
Ácidos Hidroxicinámicos (HCAs)	280 ± 20	mmol/mL
Ácidos grasos	0.51 ± 0.04	mg/mL

Los datos son presentados como el promedio ± desviación estándar.
 Datos obtenidos de Olivares 2022 ¹⁰²

4.2.2.2 Evaluación efecto del extracto de calafate en modelos celulares

En una primera etapa se evaluó el efecto del extracto de calafate sobre citotoxicidad de células PC12 y sobre la actividad espontanea de calcio en neuronas hipocampales. El esquema experimental se presenta en la Figura 4.1 y el detalle metodológico a continuación.

a) **Determinación de citotoxicidad del extracto de calafate sobre células PC12**



b) **Determinación de actividad neuronal por actividad espontánea de Calcio**

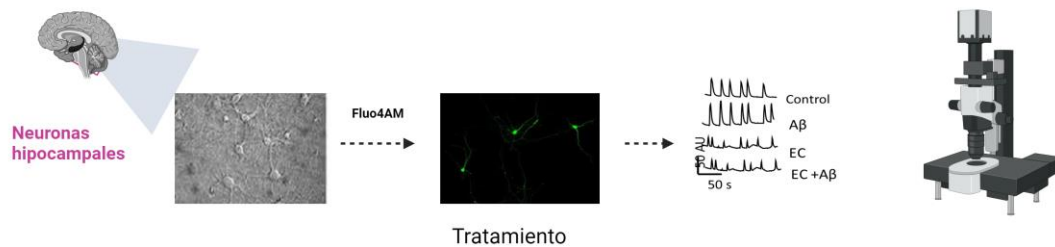


Figura 4.1 Modelo de evaluación del efecto del extracto de calafate en modelos celulares

4.3.2.2 Viabilidad en células PC-12

De acuerdo con el protocolo de Castillo y colaboradores, 2019¹²², células PC-12 (ATCC CRL-1721, EE. UU.), se cultivaron en medio Eagle modificado de Dulbecco (DMEM) (Hyclone, EE. UU.) con un 5% de suero fetal bovino, un 5% de suero equino, 100 U/mL de penicilina, 100 g/mL de estreptomycin y 2 mM de L-glutamina, se incubaron en

condiciones estándar (37 °C, 5% de CO₂). Las células PC-12 se sembraron a una densidad de 90,000 células/pocillo y se utilizaron 24 horas después del sembrado. Después de exponer las células a cada condición experimental, se incubaron con una solución de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio bromuro (MTT) (1 mg/ml) durante 30 minutos, y posteriormente, el MTT precipitado se disolvió utilizando isopropanol enfriado durante 15 minutos. El anillo de tetrazolio del MTT puede ser escindido por deshidrogenasas activas para producir un compuesto de formazán precipitado. La absorbancia se midió en un lector de placas (NovoStar, LabTech BMG, Alemania) a dos longitudes de onda: 560 nm y 620 nm, y la diferencia se cuantificó utilizando el software NovoStar para las diferentes condiciones experimentales. Utilizando el programa raphPad Prism 7. Los resultados se expresan como media ± SEM. Para el análisis estadístico de los resultados se utilizó ANOVA de una vía con prueba de Tukey o Kruskal-Wallis. La significancia estadística se consideró como: *p < 0.05, **p < 0.01, ***p < 0.001, ****p < 0.0001 en comparación con las células control.

4.2.2.3 Actividad espontánea en neuronas Hipocampales

Se utilizó cultivos primarios de hipocampo, para esto se siguieron las regulaciones recomendadas por los NIH y el Comité de Ética de la Universidad de Concepción para el tratamiento de ratas Sprague-Dawley de 18 a 19 días de gestación. Las ratas fueron profundamente anestesiadas mediante inhalación de CO₂ antes de ser sacrificadas por dislocación cervical. Los cultivos primarios de hipocampo embrionario se prepararon según lo publicado previamente (Fuentealba et al., 2012). Las células se sembraron a una densidad de 200,000 células/mL en cubreobjetos recubiertos con poli-L-lisina (70-150 kDa; Trevigen, Gaithersburg, MD). Los cultivos se mantuvieron a 37 °C con un 5% de CO₂. Los experimentos se realizaron en neuronas de control y tratadas a los 14 días in vitro (DIV) en modo agudo. Los oligómeros solubles de A β (SOAb) (rPeptide, Bogart, GA, USA) se obtuvieron mediante agitación a 37 °C y se utilizaron frescos cada día. Mediciones de Ca²⁺. Los cultivos de hipocampo se incubaron con sonda fluorescente sensible al Ca²⁺, Fluo4-AM (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) a una concentración de 5 mM durante 20 minutos en PBS utilizando condiciones estándar de incubación. Posteriormente, las células se lavaron durante 20 minutos con PBS y finalmente se lavaron 3 veces con una solución externa

normal y luego se montaron en un microscopio invertido Nikon TE2000 (Nikon, Japón). Los cambios en la fluorescencia (520 nm) se adquirieron con intervalos de 30 segundos y una exposición de 200 ms durante 55 minutos con una cámara EMCCD iXon (Andor, Irlanda). Las grabaciones se realizaron con el software Imaging Workbench 6.0 (Indec Biosystems, USA).

4.2.2.4 Diseño experimental de la intervención con animales

Para investigar el impacto del estrés oxidativo en este estudio, se utilizaron ratones C57/BL6 envejecidos y ratones J20 envejecidos como modelos de estudio. Los animales se asignaron a diferentes grupos de tratamiento, que incluyeron:

- Grupo de control (-/-): Este grupo de ratones no recibió ningún tipo de intervención especial siendo alimentados por dieta estándar.
- Grupo de dieta suplementada (+/-): Los ratones en este grupo fueron alimentados con una dieta estándar, y suplementados con jugo de calafate.

- Grupo de ejercicio aeróbico regular (-/+): Los ratones en este grupo participaron en un programa de ejercicio aeróbico regular, mientras se les proporcionaba una alimentación estándar y para beber una solución de glucosa más fructosa.

- Grupo de dieta suplementada y ejercicio aeróbico regular (+/+): Los ratones en este grupo fueron suplementados con jugo de calafate y participaron en un programa de ejercicio aeróbico regular.

Todos los animales de estudio se mantuvieron en jaulas individuales, fueron alimentados con un alimento estándar (Prolab® IsoPro® RMH 3000). Se pesaron cada viernes para evaluar su condición física.

4.2.2.5 Intervención nutricional

Con el objetivo de llevar a cabo la intervención nutricional en los animales de estudio, se asignó a cada animal una jaula individual en la que se colocó una botella de hidratación que contenía una de las dos opciones: un extracto de Calafate (5 mg/mL) rico en polifenoles para los grupos (+/-) y (+/+) o una solución de glucosa + fructosa con una concentración de azúcar similar a la del extracto de Calafate (1.81 glucosa + 1.4fructosa: mg/mL) a pH 3.3 ± 0.1 para los grupos (-/-) y (-/+) de acuerdo a lo reportado en un análisis proximal del fruto de

calafate ¹²³. Esto se hizo con el propósito de descartar que los posibles efectos observados estuvieran relacionados con los azúcares presentes en el extracto. Se registró diariamente el volumen consumido por cada animal para realizar un seguimiento preciso de la ingesta.

4.2.2.6 Entrenamiento

Los animales fueron seleccionados para el entrenamiento aeróbico en función de su disposición a correr en la cinta trotadora. Previo a cada entrenamiento aeróbico los ratones permanecieron en la sala durante 30 minutos para que se adaptaran al entorno (temperatura, humedad, lugar). Luego se siguió el siguiente procedimiento:

- Adaptación inicial a la cinta trotadora: Todos los animales fueron colocados en un carril durante 10 minutos para adaptarse al entorno.
- Inicio del entrenamiento: Todos los animales de estudio comenzaron con una velocidad de 6 m/min.
- Incremento gradual de la velocidad: La velocidad se incrementó en 1 m/min por cada minuto transcurrido.
- Evaluación de la capacidad de resistencia: A los 10 m/min, se registró la cantidad de veces que cada animal alcanzó la zona de shock.

Los mejores trotadores fueron seleccionados para el entrenamiento posterior.

La intervención aeróbica se realizó en dos oportunidades, con 5 animales cada vez. Los animales en cada grupo se calificaron en una escala de 1 a 5, donde: 1: rehusaban a correr; 2: corredores bajo el promedio (corrían esporádicamente, o en la dirección equivocada; 3: corredor promedio; 4: corredor sobre el promedio (corre consistentemente y solo ocasionalmente se va hacia atrás); 5: buen corredor (consistentemente se sitúa al frente de la cinta corredora) ¹²⁴. Y luego los 3 mejores corredores fueron seleccionados para los grupos de entrenamiento aeróbico regular (-/+) o entrenamiento aeróbico regular más ejercicio (+,+), el resto se sortearon para grupo control o grupo sólo con intervención nutricional.

Durante la primera semana de entrenamiento, se utilizó un protocolo de adaptación de los ratones de estudio, el cual consistió en:

Colocar a todos los animales en un carril de la cinta trotadora durante 10 minutos, sacar a los ratones de los grupos sedentarios.

Los animales de los grupos (-/+) y (+,+) comenzaron el protocolo de entrenamiento posteriormente con:

- 60 segundos a una velocidad de 0 m/min.
- 120 segundos a una velocidad de 10 m/min.
- 420 segundos a una velocidad de 12 m/min.
- Sprint durante 60 segundos a una velocidad de 13 m/min.

Nota: Durante la segunda, tercera y cuarta semana de entrenamiento, se aumentó la velocidad máxima a 14, 15 y m/min, respectivamente, con el objetivo de mejorar la capacidad aeróbica de los animales.

Los de finalizar el entrenamiento aeróbico, los animales se mantuvieron durante 5 minutos en la sala y luego fueron llevados a su jaula individual.

4.2.2.7 Obtención de muestras de plasma, cerebro e hipocampo

Luego de realizada la intervención nutricional durante 12 semanas y el protocolo de ejercicio aeróbico regular durante 10 semanas los animales fueron sacrificados de acuerdo con el protocolo ético de la Universidad. El procedimiento de sacrificio de los animales fue de acuerdo con Olivares y colaboradores, 2020¹⁰². La obtención de plasma fue mediante

punción cardíaca se recolectó la sangre en tubos EDTA, se centrifugó a 3000 rpm durante 10 minutos, se recolectó el plasma y se guardó a -80°C. El cerebro e hipocampo se obtuvo mediante disección, luego de la obtención de los órganos fueron sumergido en N₂ (liq) para frenar el metabolismo. Inmediatamente las muestras fueron congeladas a -80°C hasta su uso.

4.2.2.8 Protocolos de extracción para evaluación de los metabolitos

Brevemente, 25 µL de plasma fueron mezclados con 1000 µL de metanol (-20° C). Las muestras se agitaron durante 1 minuto, se mantuvieron durante 5 minutos a 4° C, y se agitaron en vortex por 5 s. Finalmente los extractos fueron centrifugados a 15700 g por 20 min a 4° C. Luego 800 µL de cada extracto se transfirió a un vial. El metanol fue removido por evaporación centrífuga al vacío a 4° C. Las muestras se reconstituyeron en 200 µL de metanol (-20°C). Los controles de calidad (QC) se obtuvieron con 20 µL de cada muestra de plasma, los QC se extrajeron bajo el mismo protocolo y se inyectaron entre las muestras para evaluar robustez y repetibilidad del sistema instrumental. La extracción se realizó en viales del vidrio para evitar contaminación por el plástico y se realizó de forma aleatoria.

El cerebro e hipocampo previo a la extracción fueron liofilizados y procesados en frío para obtener un polvo. Se pesó alrededor de 1.5 mg de cada muestra de cerebro e hipocampo por triplicado, hubo muestras en las que no fue posible el triplicado de extracción (debido a la baja cantidad de muestra disponible), luego se agregó 430 μL de metanol frío (-20°C), se agitaron en vortex por 1 minuto, se mantuvieron a (-20°C) durante 15 minutos, luego se centrifugaron a 15700 g por 5 minutos a 4°C y luego se obtuvo 350 μL de sobrenadante. El extracto metanólico fue secado mediante evaporación centrífuga durante 16 h, y luego fue resuspendido en 250 μL de fase móvil. Los controles de calidad se obtuvieron con 70 μL de cada muestra extraída y obteniendo un volumen final de 160 μL . Tanto el proceso de extracción, resuspensión y análisis fueron realizados aleatoriamente.

4.2.2.9 Métodos HPLC-ESI-QTOF-MS/MS para el análisis de las distintas muestras.

Se utilizaron 3 estrategias analíticas para el análisis de los metabolitos polares, semipolares y apolares. La Tabla 4.2 describe las condiciones cromatográficas de la metodología utilizada en cada una de ellas, indicando la columna, fases móviles, gradiente, modo y volumen de inyección. En la Tabla 4.3 se describen las condiciones del espectrómetro

de masas utilizados, tanto en modo positivo como modo negativo para el análisis de las muestras.

Tabla 4.2 Condiciones HPLC para distintos protocolos utilizados en análisis de muestras

	Método cromatográfico					
	Apolares		Semipolares		Polares	
Basado en	Patterson 2015(Patterson et al., 2015a)		Laursen 2017(Laursen et al., 2017)		Armirotti	
Tipo Fase	Fase reversa				Fase Normal	
Autosampler (°C)	4					
t° horno (°C)	50				40	
Columna	Phenomenex Kinetex® C18 de 100 x 4.6 mm				HILIC BEH Amide de 100 x 2.1 mm y 1.7 µm (Waters, Milford, MA, EE. UU.)	
FMA	ACN/H2O (60:40) 0.1% ácido fórmico, formiato de amonio 10 mM		H2O 0.1 % ácido fórmico		H2O 10 mM Formiato de amonio	
FMB	IPA/ACN (90:10) 0.1% ácido fórmico, formiato de amonio 10 mM		ACN 0.1 % ácido fórmico		ACN/H2O (95:5) 10 mM Formiato de amonio	
flujo (ml/min)	0.2		0.5		0.4	
Modo inyeccion	µL pickup					
Inyección (µL)	20 µL					
Gradiente (% FMB)	tpo (min)	% FMB	tpo (min)	% FMB	tpo (min)	% FMB
	0	32	0	0	0	100
	2	43	2	0	1	100
	4	43	6	5	17	70
	10	75	6.5	6	18	70
	12	75	13	88	19	100
	14	100	13.5	100	24	100
	15	100	14.5	0	-	-
	16	32	22	0	-	-
	21	32	-	-	-	-

Tabla 4.3 Condiciones MS/MS para análisis de muestras.

Ionización	ESI (-)	ESI (+)
Voltaje	-3500	4500
Gas Nebulizador (bar)	4	
T° (°C)	200	
End Capillar	500	
Energía colisión (ev)	oct-25	
Auto MS/MS	2 precursores/ciclo	
Rango de masas (m/z)	50 - 1500	
Escaneo	Modo centroide	
Tiempo escaneo (s)	0.2	
Calibración interna	Formiato de amonio (0.01 M)	
Precisión calibración (ppm)	< 3	

4.2.2.10 Estrategia analítica para análisis de metabolitos en muestras biológicas

En este trabajo se realizó una estrategia metabolómica, para obtener datos preliminares sobre el efecto del ejercicio y la dieta en un modelo murino, con el fin de sentar las bases para posteriores estudios de investigación, utilizando este modelo de estudio. La Tabla 4.3 representa la estrategia utilizada para el análisis de metabolitos en las diferentes muestras de los animales intervenidos. En los siguientes puntos se aborda el tipo de animales utilizados, la alimentación usada para la intervención nutricional, el entrenamiento asociado a ejercicio aeróbico y la estrategia analítica para la obtención de las muestras, el posterior procesamiento y el análisis de los resultados.

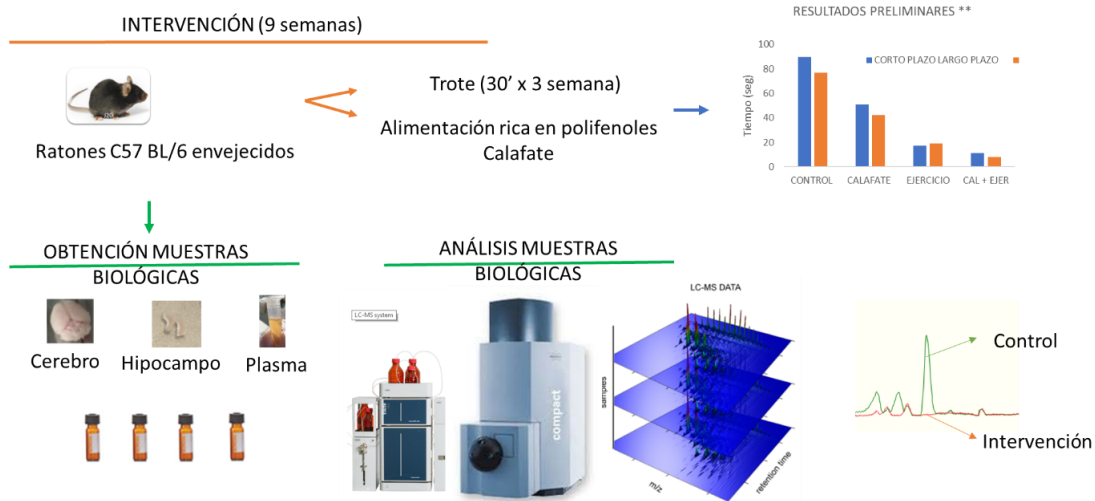


Figura 4.2 Estrategia de estudio para análisis de metabolitos

4.2.2.11 Análisis y procesamiento de datos

4.2.2.11.1 Análisis visual

Con las muestras obtenidas ($n=2$ por grupo), en una primera fase de nuestro estudio, optamos por realizar un análisis visual de los cromatogramas correspondientes a cada condición estudiada, mediante el programa Compass DataAnalyst. Utilizando esta estrategia, los cromatogramas que estaban bajo la misma condición se superpusieron y, mediante una inspección visual meticulosa, se identificaron picos cromatográficos que podrían ser diferenciadores. Luego en el mismo

software Compass DataAnalyst, se obtuvo el espectro de masas de cada peak seleccionado y su fragmentación. Con la información obtenida se recurrió a las bibliotecas disponibles como (<https://msbi.ipbhalle.de/MetFrag/>), HMDB (base de datos del metaboloma humano) (<https://hmdb.ca/>) y METLIN (https://metlin.scripps.edu/landing_page.php?pgcontent=mainPage) y mediante la comparación de la masa precisa y la información de fragmentos obtenida del UHPLC-QTOF/MS se realizó la identificación (Laursen et al., 2017).

4.2.2.11.2 Generación de “Bucket Tablet”

A pesar del bajo número de muestras obtenidas, se utilizó una estrategia analítica metabolómica, que consistió en generar “Bucket Tablet” en el programa MetaboScape 3.0, con el algoritmo T-REX 3D, de acuerdo con los parámetros que se muestran en la Tabla 4.4. Con el algoritmo T-REX 3D se realiza una alineación automática del tiempo de retención sin la necesidad de ajustar parámetros y la extracción completa de regiones, se extrae toda la información relevante que permite una identificación confiable de metabolitos. Al mismo tiempo, esta tecnología contribuye a reducir la tasa de falsos negativos en el análisis estadístico, mejorando así la precisión de los resultados. Así el software transformó los datos

brutos en una matriz con los “señales” (m/z; (tR); intensidad de pico normalizada) en un archivo: .csv. El flujo de trabajo incluyó la recalibración de masa, alineación de tR, extracción de “señales” (pares m/z; tR), administración de aductos y pérdida neutra, importación de espectros MS/MS y generación de la bucket table.

Tabla 4.4 Parámetros para generación de Bucket Tablet

	Método					
	Polar		Semipolar		Apolar	
	Pos	Neg	Pos	Neg	Pos	Neg
Intensity Threshold (count)						
Minimum peak length (spectra)	150	150	150	150	200	200
Minimum peak length (recursive spectra)	10	9	7	8	17	26
Minimum peak length (recursive spectra)	9	8	6	7	16	25
Minimum # señales for extraction	3	3	3	3	3	3
Presence of señales in minimum # of analyses	3	3	3	3	3	3
Lock Mass calibration (LMC)	false	false	false	false	false	false
Mass calibration	true	true	true	true	true	true
Primary Ion	[M+H] ⁺	[M-H] ⁻	[M+H] ⁺	[M-H] ⁻	[M+H] ⁺	[M-H] ⁻
Seed Ion	[M+H] ⁺ ; [2M+H] ⁺ ; [M+HCOOH] ⁺ [M+Na] ⁺	[2M-H] ⁻ ; [M+HCOO-H] ⁻ +	[M+H] ⁺ ; [2M+H] ⁺ ; [M+HCOOH] ⁺ [M+Na] ⁺	[2M-H] ⁻ ; [M+HCOO-H] ⁻ +	[M+H] ⁺ ; [2M+H] ⁺ ; [M+HCOOH] ⁺ [M+Na] ⁺	[2M-H] ⁻ ; [M+HCOO-H] ⁻ +
Common Ions	[M-H ₂ O+H] ⁺	[M-H ₂ O-H] ⁺	[M-H ₂ O+H] ⁺	[M-H ₂ O-H] ⁺	[M-H ₂ O+H] ⁺	[M-H ₂ O-H] ⁺
EIC Correlation	0.8	0.8	0.8	0.8	0.8	0.8
Mass range: start [m/z]	50	50	50	50	50	50

Mass range: end [m/z]	1500	1500	1500	1500	1500	1500
Group by collision energy	false	false	false	false	false	false
MS/MS Import method	average	average	average	average	average	average
Retention time range: Start (min)	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5
Retention time range: End (min)	17	17	13.5	13.5	14	14
Perform MS/MS import	true	True	true	true	true	true

4.2.2.11.3 Prefiltro de datos por MetaboAnalyst

Las Bucket Tablet generadas previamente se procesaron en el software MetaboAnalyst (<https://www.metaboanalyst.ca/>). El primer paso es realizar el filtrado de los datos, en este caso considerando $RSD > 20\%$, en comparación con los controles de calidad (QC) que es lo recomendado para datos LC-MS, con el objetivo de identificar y eliminar variables que no sean útiles para modelar los datos, este paso se recomienda para análisis con un gran número de variables, como es el caso de nuestro estudio. Luego se realizó un análisis de componentes principales (PCA), donde mediante el gráfico de “Score Plot” se visualizaron la dispersión de las muestras QCs e identificaron posibles outlier. Como se mencionó anteriormente, como el número de muestras no fue suficiente para realizar análisis metabolómicos, todos los datos obtenidos fueron comparados con los cromatogramas para obtener información visual de las señales seleccionadas.

4.2.2.11.4 Filtrado y selección de señales

En el programa MetaboAnalyst 5.0 se realizó un filtrado de la data eliminando los controles de calidad (QC) y los valores atípicos (outliers). Luego, la nueva Bucket Tablet se procesó nuevamente y se aplicó

nuevamente una normalización de las variables mediante el escalonado según el método de Pareto (Consiste en centrar los datos a la media y luego dividirlos por la raíz cuadrada de la desviación estándar de cada variable). Esta técnica reduce la importancia relativa de los valores grandes y, al mismo tiempo mantiene parcialmente la estructura de los datos ¹²⁵

Posteriormente se realizó un análisis por PCA y Volcano plot. En el Volcano plot se estableció un Fold change threshold (cambio con respecto a la referencia) de 1.5 y un $p = 0.05$ con FDR (taza de descubrimientos de falsos positivos) mediante lo cual se seleccionaron las señales significativas.

4.2.2.11.5 Flujo de trabajo de anotación de metabolitos

La elección de los metabolitos se realizó con ayuda del software DataAnalysis, a cada “señal” encontrado se seleccionó la fórmula molecular con el menor error de masa (ppm) y $m\sigma$ ($m\sigma$). $m\sigma$ es una medida de la concordancia entre el patrón isotópico teórico y el patrón isotópico medido del pico de masa de interés. Combina la desviación estándar de las masas y las intensidades de todos los picos isotópicos. Los espectros se enviaron a bases de datos como MetFrag,

HMDB y METLIN mediante la comparación de la masa precisa y la información de fragmentos obtenida del UHPLC-QTOF/MS ¹²⁶. Finalmente, se llevó a cabo la confirmación de la identidad del metabolito más relevante encontrado mediante comparación con estándar (tiempo de retención (tR) y/o espectro de fragmentación. La anotación de metabolitos se basó en la guía de anotación, cuantificación y mejores prácticas de informe propuesta por ¹²⁷

4.2.3 **Resultados**

4.2.3.1 Efecto del extracto de calafate sobre viabilidad de células PC-12

Con el propósito de investigar el impacto del extracto etanólico de calafate en un modelo celular. Células PC12, se expusieron a diferentes concentraciones del extracto de calafate o a una solución azucarada de glucosa y fructosa, para descartar que el efecto provocado sea por el contenido de azúcares presentes en el extracto etanólico.

En la Figura 4.3 A: Efecto del extracto del fruto de calafate (EC) sobre viabilidad de células PC12; B: Efecto de una solución de azúcares (Glucosa + Fructosa) sobre viabilidad de células PC12. FCCP: control de muerte celular n=3, análisis ANOVA, post hoc Tukey. Figura 4.3 a) se observa que una dilución de 1:10 (85 mg/L) del extracto de calafate tuvo un efecto significativo en la viabilidad de las células PC12, mientras que las diluciones menores a 1:100 (8.5 mg/L) no afectaron la viabilidad celular. En la Figura 4.3 b) se observa el efecto de una solución acuosa azucarada en las mismas proporciones que en el extracto de calafate, evaluando si el efecto de la viabilidad se debía a un cambio en la osmolaridad de la solución o a la cantidad de azúcares presentes en el extracto. Los resultados indican que las diluciones de la solución acuosa y las concentraciones de azúcares presentes en concentraciones similares a las presentes en el extracto no tuvieron ningún efecto en la viabilidad de células PC12.

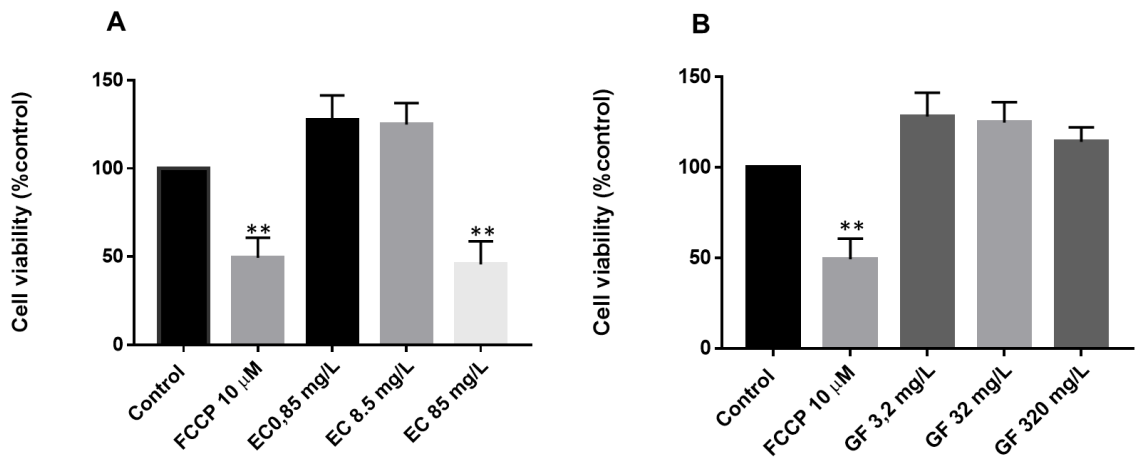


Figura 4.3 A: Efecto del extracto del fruto de calafate (EC) sobre viabilidad de células PC12; B: Efecto de una solución de azúcares (Glucosa + Fructosa) sobre viabilidad de células PC12. FCCP: control de muerte celular n=3, análisis ANOVA, post hoc Tukey.

4.2.3.2 Efecto del extracto de calafate en actividad neuronal aguda

Luego de encontrar concentraciones celulares seguras para la viabilidad en la línea celular PC12, se evaluó en un cultivo primario de neuronas hipocámpales el efecto del extracto de calafate y una solución azucarada en las concentraciones indicadas en la Figura 4.4 Se midió la actividad espontánea de calcio durante 200 segundos y cada pico generado se

contabilizó. Las neuronas hipocampales expuestas al péptido A β 1-40 mostraron un aumento en la actividad espontánea de calcio lo cual había sido observado en el estudio de Sáez-Orellana et al. (2016) ¹²⁸, sin embargo, el extracto de calafate asociado a la misma concentración de la solución azucarada (0.87 mg/L) tuvo un efecto inhibitorio en la actividad espontánea de calcio. Diluciones mayores del extracto de calafate no tuvieron un efecto significativo en la actividad espontánea de calcio.

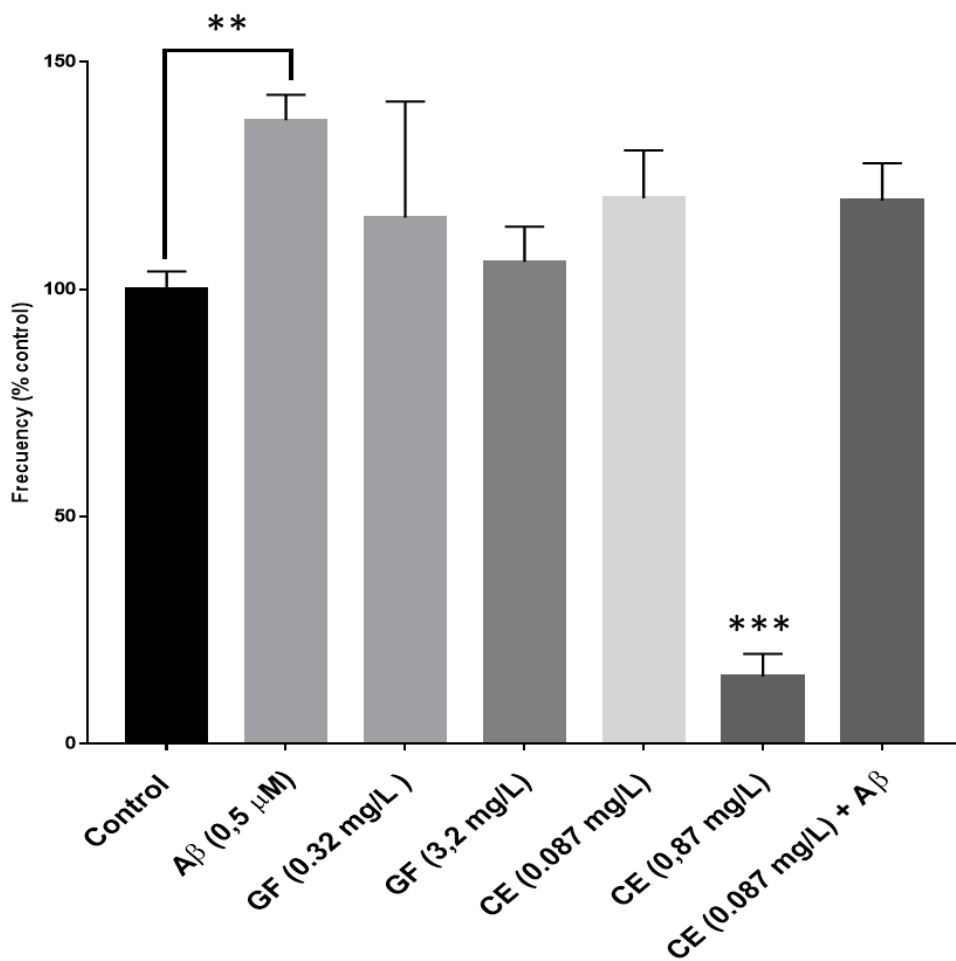


Figura 4.4 Actividad espontánea de calcio en neuronas del hipocampo en presencia de extracto de calafate, una mezcla de glucosa y fructosa (G+F) y péptido A β , n > 5. ANOVA, post hoc Tukey

4.2.3.3 Ensayo animal

4.2.3.3.1 Evolución en el peso de los animales consumiendo extracto de calafate y realizando ejercicio aeróbico regular

La implementación de una intervención nutricional y deportiva demostró tener un impacto en la evolución del peso de los animales bajo estudio. Figura 4.5 Luego de la intervención de 10 semanas de ejercicio físico regular y 12 semanas de alimentación con el extracto de calafate los animales tuvieron algunos cambio en el peso. El análisis se realizó en base al peso inicial de cada animal que corresponde a un 100%. Los animales fueron pesados semanalmente, pero para el fin de evaluar el efecto del ejercicio y del consumo de calafate, se compararon los pesos en la semana 10.

Como se observa en la Figura 4.5, los animales que realizaron ejercicio aeróbico regular (-/+) y (+/+) tuvieron una baja de peso considerable con relación al peso inicial. Interesantemente el grupo (+/+) tuvo un cambio significativo en el peso, bajando a un 90.71% con respecto al peso inicial. El grupo que solo realizó ejercicio (-/+) no tiene una diferencia significativa con respecto a su peso inicial, si existe una clara tendencia a la baja de peso. Finalmente, el grupo control (-/-) no mostró diferencias significativas en relación con su peso inicial, aunque la dispersión de los

datos es muy amplia, lo que genera datos no concluyentes. El grupo de animales que solo consumió el extracto de calafate y no llevó a cabo ejercicio físico (+/-) no tuvo diferencias significativas con respecto al peso inicial, aunque se observa una leve tendencia al alza.

Cambio en el peso durante la intervención

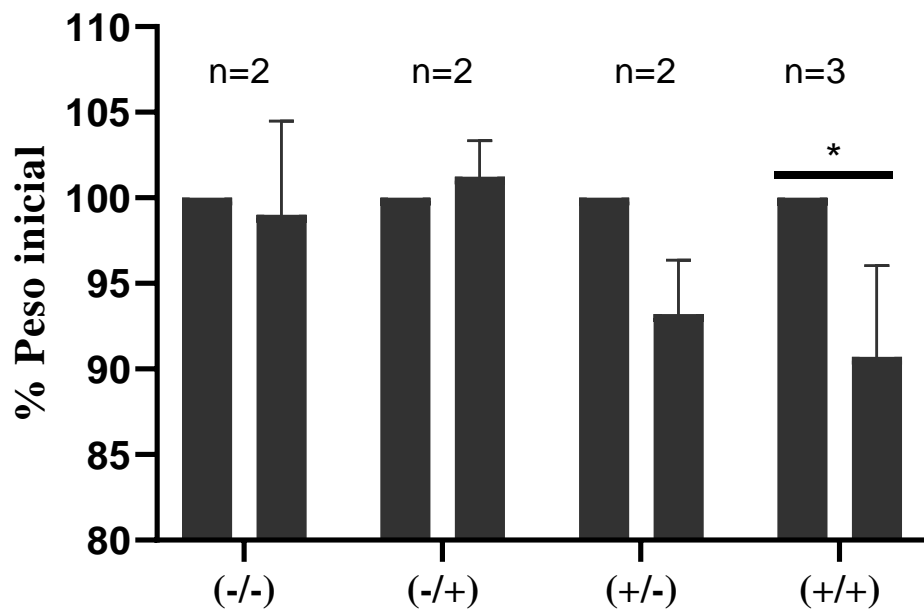


Figura 4.5 Cambio en el peso de los animales de estudio. Barra de la izquierda corresponde al peso inicial, barra de la derecha corresponde al peso al término del tratamiento. (ANOVA de dos vías, mediante comparación múltiple entre el promedio de cada valor dentro de la columna, Post-Hoc, test de comparación múltiple de Bonferroni's multiple (p=0.0201))

4.2.3.4 Análisis visual

4.2.3.4.1 Análisis de muestras de plasma

4.2.3.4.1.1 Análisis metodología semipolar

El objetivo de este estudio es identificar las diferencias en los metabolitos plasmáticos causadas por una intervención nutricional y un programa de ejercicios aeróbicos regulares en un modelo de ratones envejecidos, los cuales presentan un aumento del estrés oxidativo. Para lograr esto, se emplearon dos estrategias: la revisión visual de los cromatogramas y el análisis a través de una estrategia metabolómica.

Como ejemplo, en la Figura 4.6 se observan los cromatogramas del pico base (BPC, por sus siglas en inglés) de todas las muestras de plasma, procesadas por la metodología para analitos semipolares, mediante ionización positiva. La observación detallada reveló una adecuada alineación al comparar los picos en común, particularmente en las primeras señales cercana a los 2 minutos (la alineación de los cromatogramas fue realizada por el programa Compass DataAnalysis). Mediante la observación visual se determinó que existe una diferencia en los picos del Grupo control (-/-) versus el resto de los grupos (+/-); (-/+) y (+/+) durante el intervalo de 9 a 10 minutos.

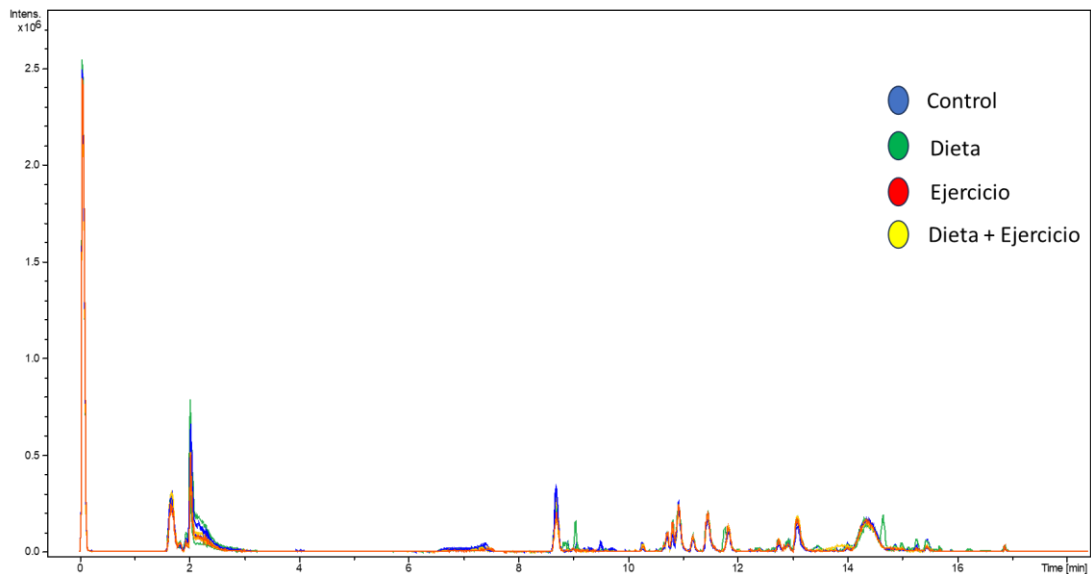


Figura 4.6 Cromatograma del pico base (BPC) para Método Semipolar en modo ESI positivo de todas las muestras de plasma analizadas. Azul: Grupo control; Verde: Dieta (+/-); Rojo: Ejercicio (-/+); Amarillo: Dieta + ejercicio (+/+) (n=2 para cada condición)

En la Figura 4.7 se muestra con mayor detalle la diferencia en los los BPC de las muestras en los tiempos observados, realizando un zoom al área donde se seleccionó el peak diferenciador. Posteriormente, utilizando la información otorgada por el software Compass DataAnalysis, se constató que el pico correspondiente a 9.5 minutos presentaba una diferenciación notoria entre el grupo control (-/-) y los demás grupos que habían sido intervenidos.

Mediante el empleo del programa DataAnalysis®, se obtuvo la información relevante del ión pseudomolecular, $[M+H]^+$, su error, fórmula molecular y los iones fragmentos. Posteriormente, a partir de la información obtenida, se buscó en las bibliotecas disponibles y buscamos la identidad como se muestra en Figura 4.7, en la que se determinó que dicho pico correspondía al ácido 3-Oxodeoxicólico o ácido 12- α -3-oxo-5 β -colón-24-oico.

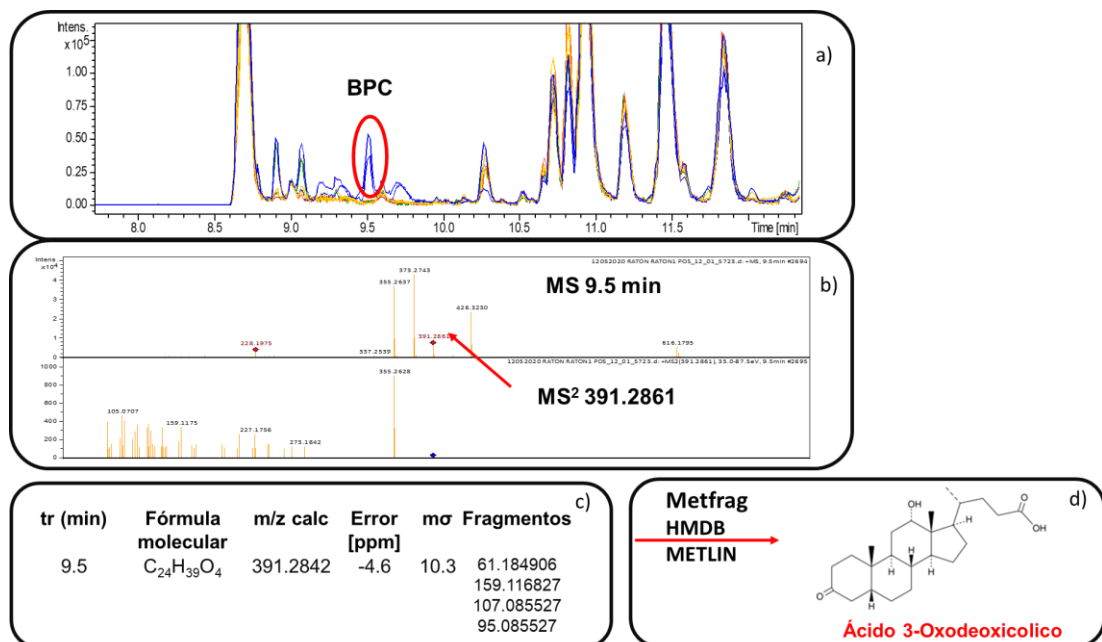


Figura 4.7 Mecanismo de búsqueda de metabolitos diferenciadores. En la figura a) se muestra un ejemplo de la búsqueda visual en el cromatograma del pico base (BPC) donde se identificaron picos

diferenciadores, luego en b) se realizó el análisis MS a tiempo 9.5 y el MSMS del ión 391.2861 m/z. En c) los datos obtenidos a través del programa DataAnalysis, en d) la identificación realizada con ayuda de las bibliotecas disponibles.

Siguiendo con el análisis visual, en la Figura 4.8 se muestran los BPC para la metodología semipolar basada en Laursen y colaboradores, 2017¹²⁶. Según los parámetros de la Tabla 4.2, esta metodología nos permitió identificar algunos metabolitos semipolares-polares, donde fue identificado nuevamente el ácido taurocólico y otros metabolitos de los ácidos biliares

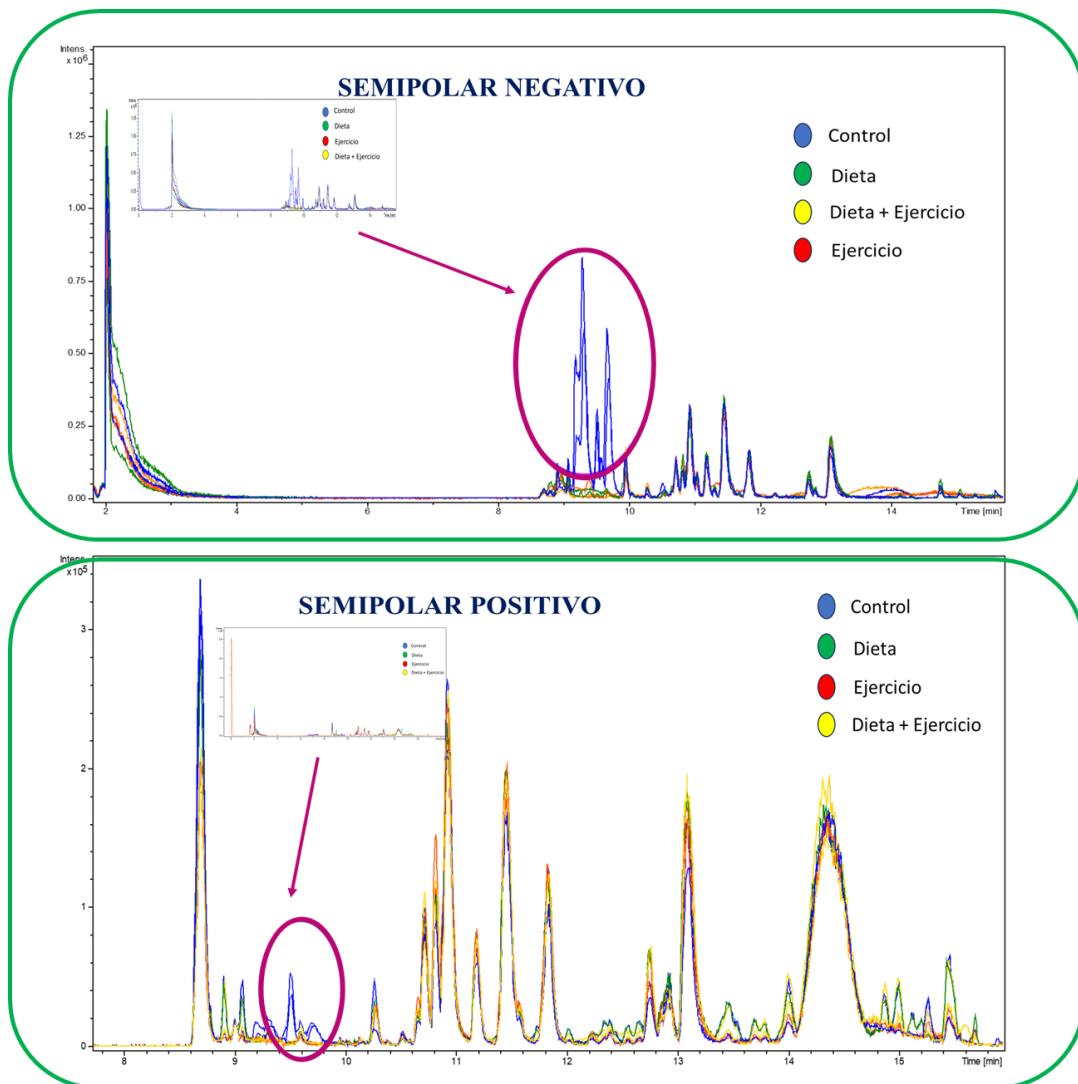


Figura 4.8 Cromatogramas BPC para la metodología semipolar en muestras de plasma. Se observa el cromatograma del pico base y se realiza un zoom para identificar los picos diferenciadores.

Además del ácido 3-Oxodexicólico otros metabolitos fueron encontrados a través de este mecanismo con esta metodología como se indica en la Tabla 4.5.

Tabla 4.5 Identificación de metabolitos a través de metodología semi-polar.

tr	FM	[M+H] ⁺	error [ppm]	mσ	Iones fragmentos	Identificación
9.5	C24H39O 4	391.284286	-4.6	10.3	107.0855; 159.1168; 95.0855; 261.1849	Ácido-3-oxodeoxicólico
9.5	C49H80N 5O6	834.610312	0.3	5.4	355.2631; 373.273	PC(22:5(4Z,7Z,10Z,13Z,19Z)- O(16,17)/P-18:0) is an oxidized phosphatidylcholine
9.7	C30H41N 6O3	533.323466	-5	19.2	126.0219; 227.1423	no identificado

4.2.3.4.1.2 Análisis metodología apolar

La Figura 4.9 muestra los cromatogramas de las muestras procesadas mediante la metodología apolar en modo negativo y positivo, utilizando la metodología descrita por Patterson 2015,¹²⁹ El mecanismo de identificación por análisis visual de todas las muestras de plasma nos permitió identificar a un tR de 5.1 min el ion pseudomolecular [M-H]⁻ de

514.2840 m/z, el cual según las bibliotecas disponibles correspondería a ácido taucólico.

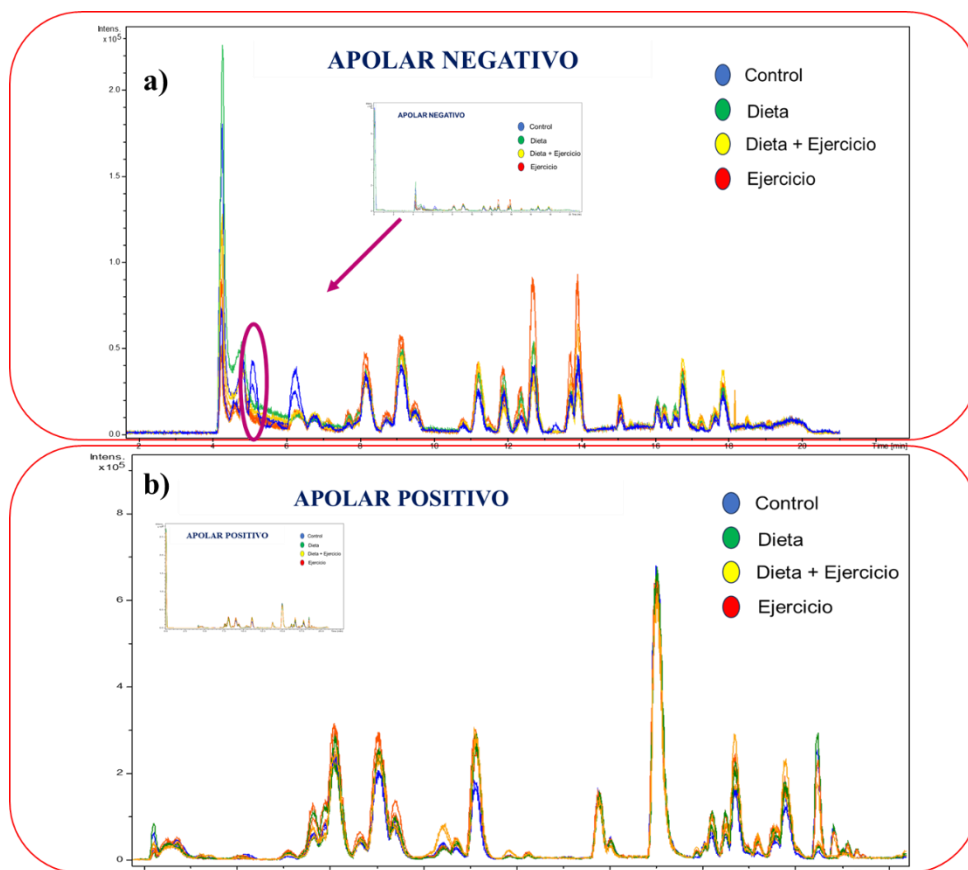


Figura 4.9 Cromatograma del pico base (BPC) en modo negativo y positivo para compuestos apolares en plasma

4.2.3.4.1.3 Análisis metodología polar

La Figura 4.11 muestra los BPC para las muestras de plasma procesadas por la metodología en fase normal utilizando una columna HILIC BEH Amide®. Esta columna posee una fase estacionaria con grupos amida que proporciona interacciones hidrofílicas con los metabolitos de las muestras y que nos permitió separar los metabolitos más polares presentes en la muestra, tanto en modo negativo y positivo, la inspección visual sólo nos permitió identificar un pico diferenciador correspondiente al ácido taurocólico, el cual había sido identificado previamente a través de las otras metodologías estudiadas.

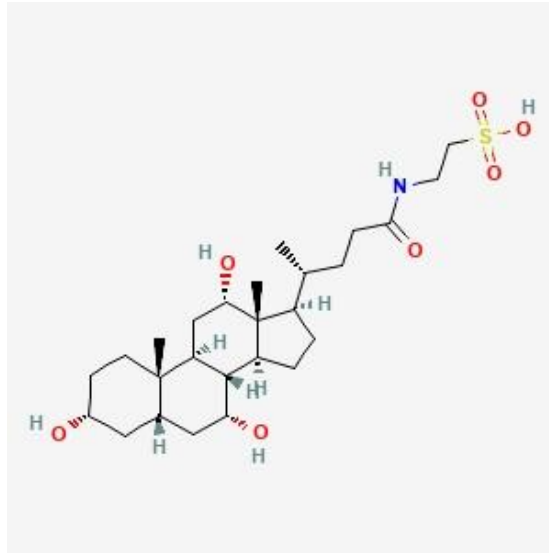


Figura 4.10 Estructura del Ácido taucólico (Imagen tomada de Pubchem), se observa la cadena lateral altamente hidrofílica por la y el anillo esteroide de comportamiento hidrofóbico.

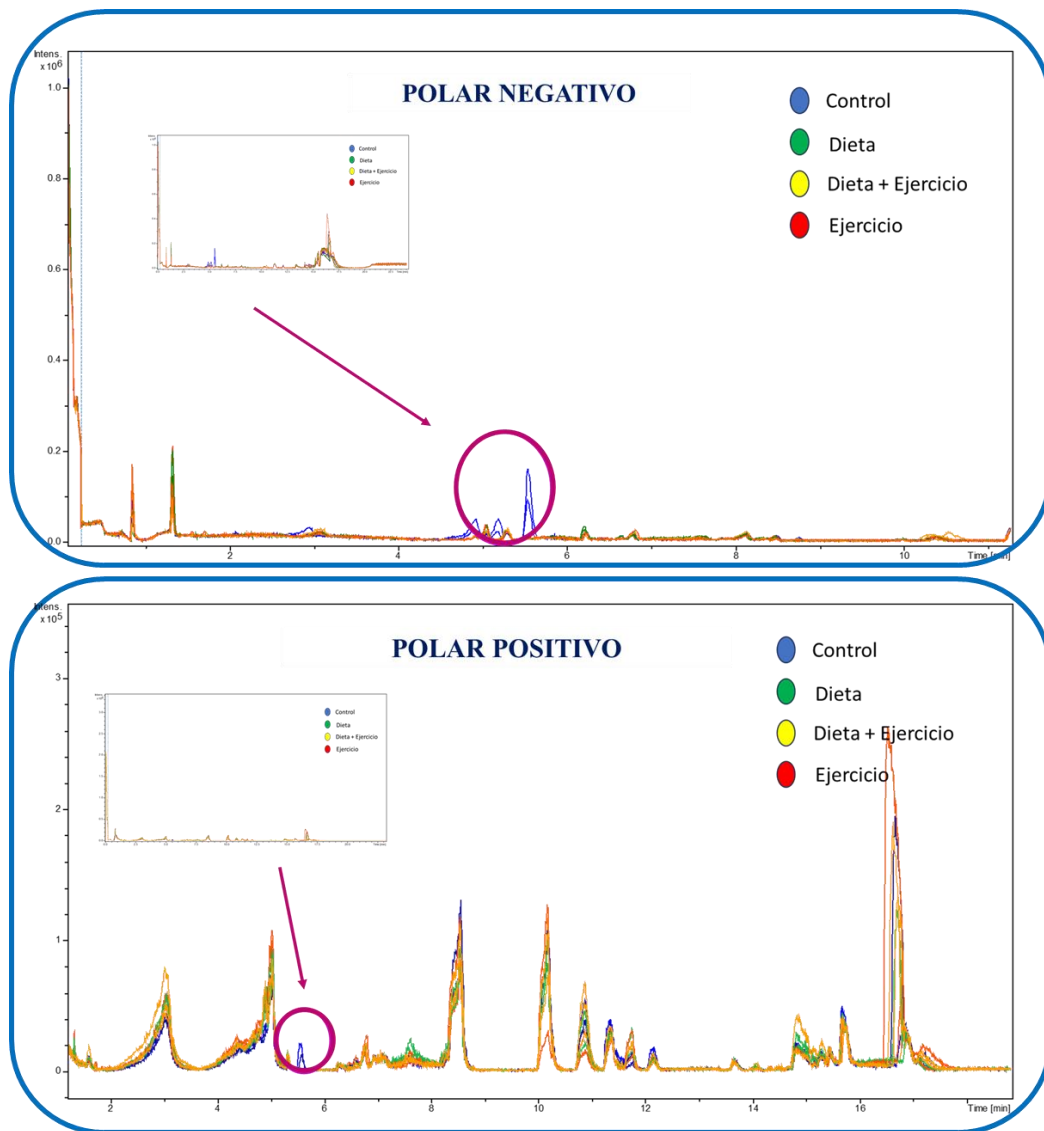


Figura 4.11 Cromatogramas BPC para la metodología polar (HILIC) en muestras de plasma. Se observa el cromatograma del pico base y se realiza un zoom para identificar los picos diferenciadores.

La Tabla 4.6 resume los metabolitos identificados mediante la inspección visual de los cromatogramas. Un total de 8 picos diferentes

fueron encontrados, dentro de los cuales 3 siguen no identificados. Se encontraron 2 metabolitos de ácidos biliares, el ácido taucólico y el ácido 3-oxodeoxycólico. Además, se identificó un metabolito oxidado de la fosfatidilcolina, la PC(22:5(4Z,7Z,10Z,13Z,19Z)-O(16,17)/P-18:0).

Tabla 4.6 Metabolitos plasmáticos identificados mediante inspección visual.

Método	tr	FM	[M+H] ⁺ /[M-H] ⁻	Iones fragmentos	error [ppm]	mσ	Identificación
Apolar Negativo	6.3	C26H44NO7S	514.284	106.9818; 124.0084; 512.2695; 513.2720	0.77	-	ácido taurocólico
Apolar Negativo	6.3	C17H38N5O6	408.2828	-	-1.2	-2.9	no identificado
	9.5	C24H39O4	391.2843	107.0855; 159.1168; 95.0855; 261.1849	-4.6	10.3	ácido 3-oxodeoxicólico
Semipolar Positivo	9.5	C48H85NO8P	834.6103	355.2631; 373.273	0.3	5.4	PC(22:5(4Z,7Z,10Z,13Z,19Z)-O(16,17)/P-18:0
	9.7	C30H41N6O3	533.3235	126.0219; 227.1423	-5	19.2	no identificado
Semipolar Negativo	9.1	C13H24N6O3	242.1762		2.8	7.1	no identificado
Polar positivo	5.6	C26H42N1O7	516.2956	104.1067; 124.9979; 337.2475.	-1.4	14.2	ácido taurocólico
Polar negativo	5.6	C26H44NO7S	514.2843	248.9744	-	-	ácido taurocólico

4.2.3.4.2 Análisis de muestras de cerebro e hipocampo

Desafortunadamente, el análisis visual de las muestras de cerebro e hipocampo no arrojaron metabolitos diferenciadores, como se observa en los BPC del método apolar de las muestras de cerebro (Figura 4.12)

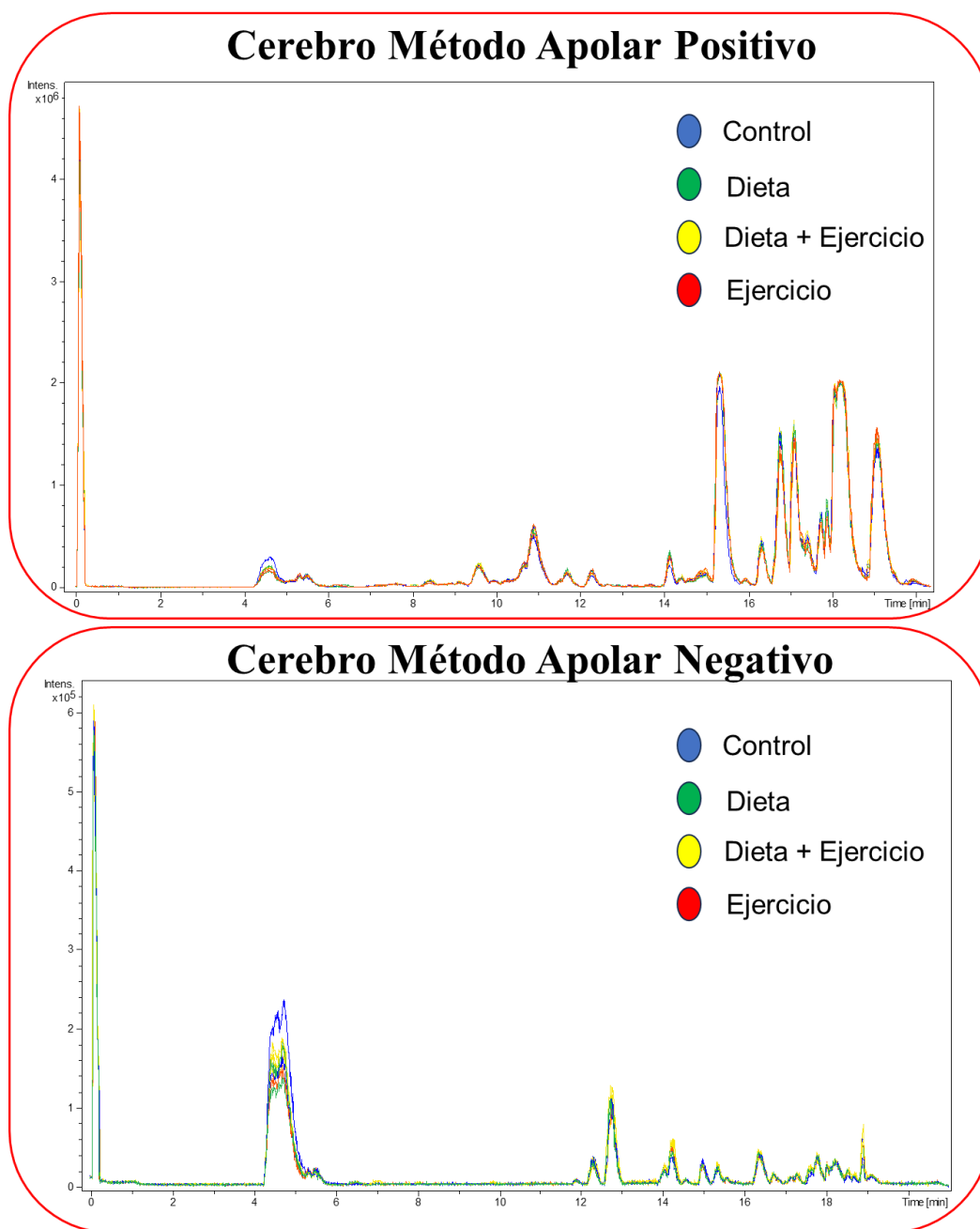


Figura 4.12 Cromatogramas BPC para muestras de cerebro a través de la metodología apolar. a) modo positivo, b) modo negativo.

4.2.3.5 Análisis a través de estrategia metabolómica

La estrategia metabolómica se llevó a cabo modificando la estructura de los grupos de estudio, quedando conformados de la siguiente manera:

Control vs Dieta: Para ver el efecto del suplemento en el metabolismo de los animales se compararon los grupos (-/-) y (-/+ vs (+/-) y (+/+) n=2 para cada grupo, excepto n=3 para el grupo (+/+)

Control vs Ejercicio: Para ver el efecto del ejercicio en el metabolismo de los animales se compararon los grupos (-/-) y (+/-) vs (-/+) (+/+), con un n= 4 y n=5 para cada grupo respectivamente.

Posterior a la conformación de los nuevos grupos de estudio, mediante el programa MetaboScape de Bruker se generaron las BT para cada metodología de estudio en modo positivo y negativo, y se realizó un análisis de tipo metabolómico para encontrar las señales de interés.

4.2.3.5.1 Evaluación del efecto del consumo de calafate mediante análisis PCAs

En la Figura 4.13 se observa el gráfico de 'Score Plot' derivado del análisis PCA realizado en las muestras de plasma correspondientes a los grupos que consumieron calafate, el grupo que no consumió calafate y

los Controles de Calidad (QCs), todos procesados mediante la metodología polar. Este gráfico representa la distribución de las muestras de plasma procesadas mediante el método polar en un espacio bidimensional, donde el eje x corresponde al componente principal 1 (PC1), el cual explica el 20.5% de la varianza entre las muestras y el eje y corresponde al PC2 que nos explica el 17.8% de la variabilidad de las muestras

El "Score Plot" nos brindó una representación visual de variación y agrupación de los distintos grupos de muestras en función del consumo o no de calafate, así como los controles de calidad, como se observa claramente en la Figura 4.13, los QCs se agruparon en el centro del gráfico, indicando una baja variabilidad técnica en el estudio y la estabilidad de las muestras analizadas durante el proceso ¹³⁰.

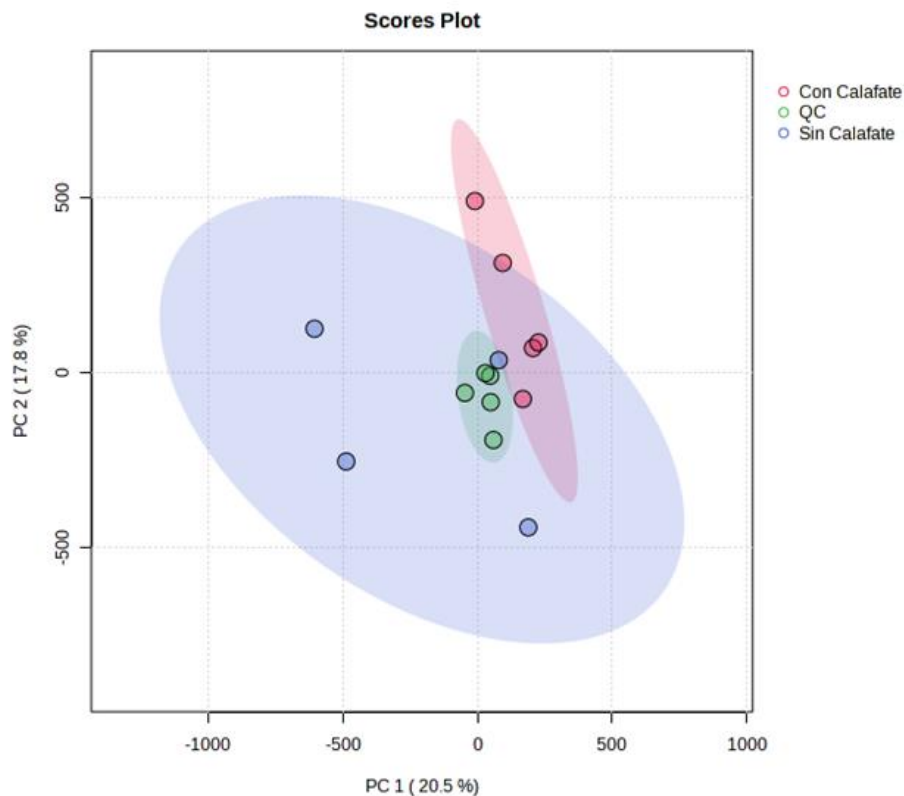


Figura 4.13 Score Plot del PCA de las muestras de plasma procesadas mediante método polar. El eje x representa el componente principal 1 (PC1) vs el eje y que representa el componente principal 2. Se observan los QCs (verde) en el centro del gráfico, las muestras control (verde) y las muestras que consumieron calafate (rojo)

Con relación a las muestras, del gráfico de Score plot se desprende una clara tendencia a la separación entre el grupo control y el grupo que consumió calafate regularmente. Como se observa claramente en el gráfico, el grupo que consumió calafate se encuentra perfectamente agrupado, y el grupo de muestras sin calafate presentan una gran

dispersión en el gráfico, existiendo una muestra que tiende a agruparse con el grupo que consumió calafate, lo que representa claramente un outlier.

Posterior a la primera visualización de la data, se eliminó del set de muestras los QCs y outlier, porque no nos estarían aportando información relevante para encontrar las posibles señales relevantes. Se realizó nuevamente el análisis no supervisado mediante PCAs (Figura 4.14) para evaluar la separación espontánea de los grupos.

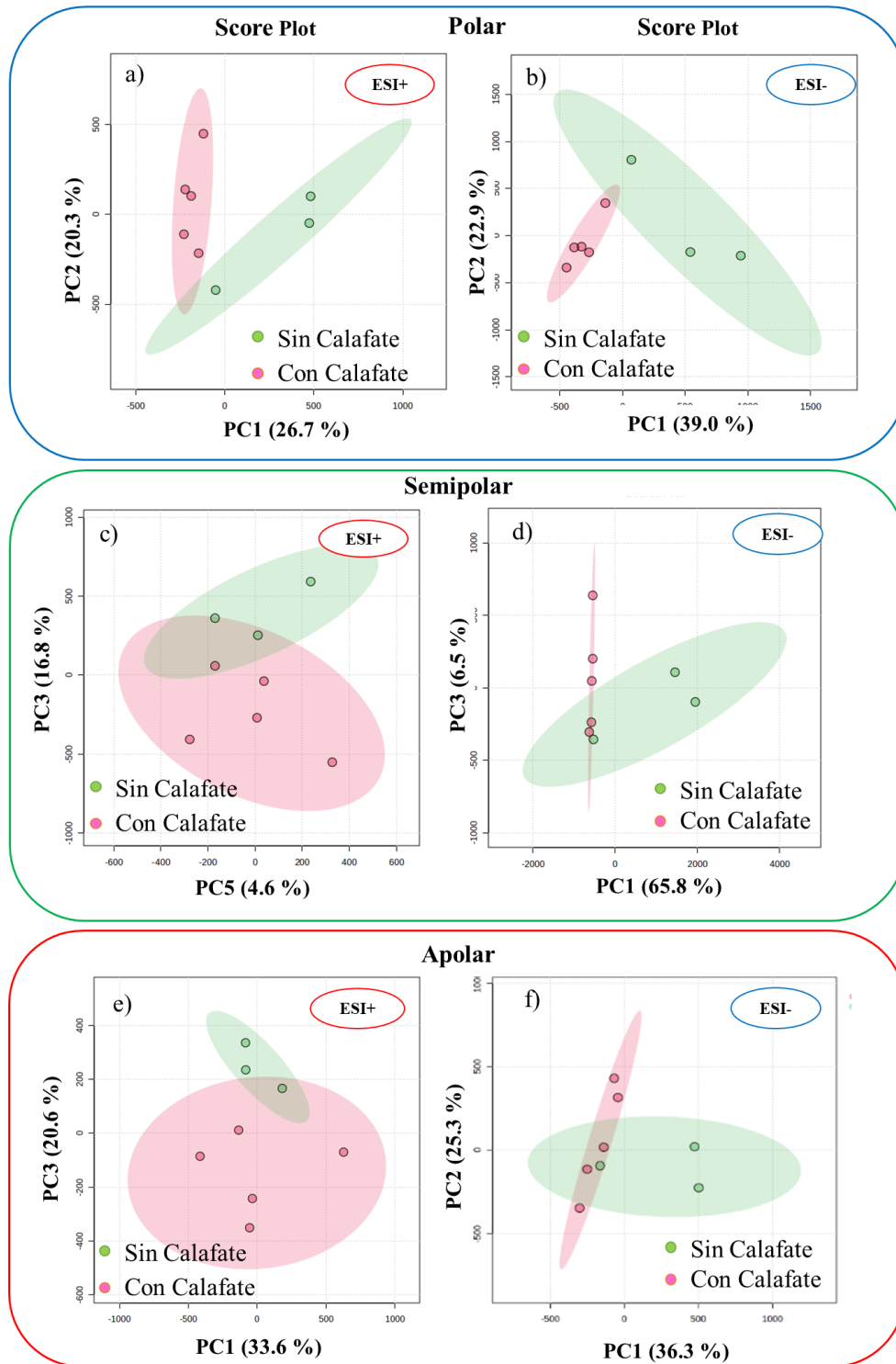


Figura 4.14 PCAs intervención nutricional para muestras de plasma: Se muestran los score Plot para cada metodología (polar, semipolar y apolar) en modo ESI+ y ESI-: Los parámetros para el PCA se describen

en metodología. Solo el gráfico c) muestra el PC1 vs PC4 que representaba la mejor separación entre los grupos de muestra.

4.2.3.5.2 Evaluación del efecto del ejercicio aeróbico regular mediante análisis exploratorio PCAs

Para evaluar el efecto del ejercicio sobre los metabolitos plasmáticos de los animales de estudios, se reorganizaron los grupos entre los animales que realizaron ejercicio aeróbico regular (n=5) versus los animales sedentarios (n=4), y al igual que el análisis sobre el efecto del consumo de calafate, se realizó un análisis no supervisado, mediante PCA en la plataforma Metaboanalyst (metaboanalyst.ca).

La Figura 4.15 muestra los gráficos Score Plots. Estos, luego de eliminar del set de datos los QCs y los outlier. Los resultados a través de las tres metodologías sugieren que el grupo que realizó ejercicio aeróbico regular (rojo: con ejercicio) formó un grupo altamente compacto. El grupo sin ejercicio (verde, n=4), tiene una distribución más amplia en el plano

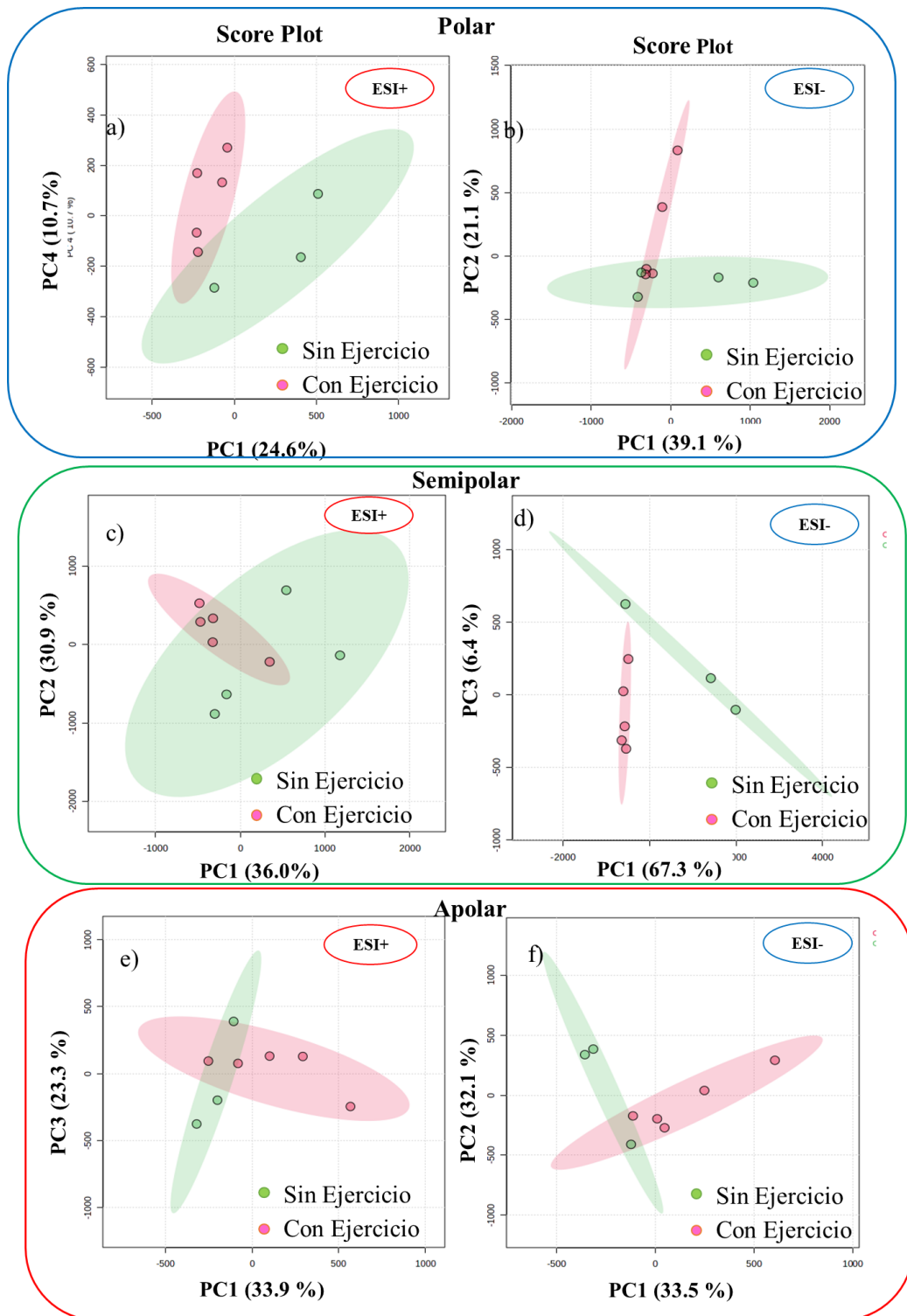


Figura 4.15 PCAs intervención deportiva en muestras de plasma: Se muestran los score Plot para cada metodología: a) y b) metodología

polar; c) y d) metodología semipolar; d) y e) metodología apolar, todas en modo ESI+ y ESI-. Se muestra la mejor separación entre los grupos con los PCAs correspondientes.

En este trabajo no se incluyen los gráficos de “Loading Plots” (que indican que variables tienen un peso mayor la separación grupos) generado en el análisis PCA, ya que la identificación de variables importantes para la separación de los grupos se llevó a cabo a través de Volcano Plots.

4.2.3.5.3 Búsqueda de metabolitos diferenciadores mediante Volcano Plots

La búsqueda de señal o metabolitos diferenciadores se realizó a través del análisis estadístico VolcanoPlot en MetaboAnalyst (Figura 4.16). El análisis mediante VolcanoPlot combina los resultados del análisis de Fold Change y el test-t. En este trabajo se utilizó un Fold change de 1.5, por lo cual los cambios en las señales deben ser mayores o iguales a 1.5 veces en magnitud entre los dos grupos de estudio. Para la relevancia estadística de los resultados utiliza un test-t con un $p=0.05$ FDR (para realizar el descarte de falsos positivos). Específicamente en el gráfico

presentado en la Figura 4.16 a), el eje x representa el Fold Change entre las distintas condiciones y el eje y representa el valor $-\log_{10}(p)$.

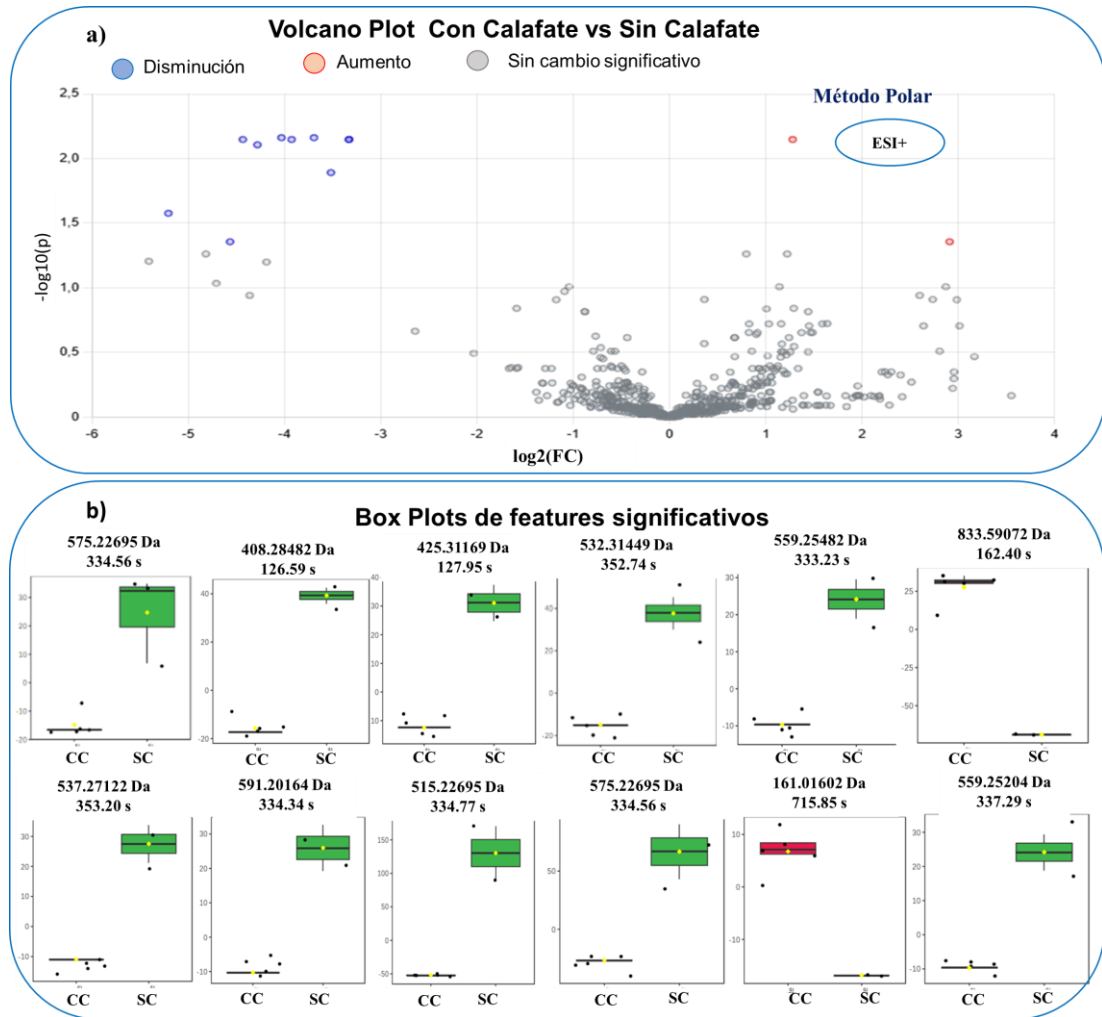


Figura 4.16 Volcano Plot y señales identificadas mediante el análisis de las BT de la intervención nutricional mediante metodología polar.

En el gráfico Box plot observado en la Figura 4.16 b), se observan las señales diferenciadoras entre el grupo Con Calafate (CC) vs el grupo Sin Calafate (SC), que se encuentran disminuídas (verde) o aumentadas (rojo) en el grupo Con Calafate.

El análisis mediante Volcano Plot de la metodología polar comparando el grupo que consumió calafate (CC) frente al grupo que no consumió calafate (SC), nos entregó 12 señales pertenecientes a metabolitos diferenciadores. De estas señales, 10 metabolitos se encuentran disminuidas en el grupo que consumió el extracto de calafate (CC), mientras que solo dos mostraron un aumento.

El mismo enfoque para la identificación de metabolitos diferenciadores se llevó a cabo mediante Volcano Plots en ambos modos, positivo y negativo, tanto para distinguir las señales entre los grupos que consumieron calafate y los que no, como para distinguir las señales entre los grupos que realizaron ejercicio aeróbico regular y el grupo sedentario.

En la Tabla 4.7 se muestra un recopilado de todas las señales identificados para cada condición. Hay señales que se repiten en más de un método, como es el caso de las señales con un m/z de 515.28996 y un

tR de 5.58 min encontrado en método polar positivo control vs dieta, y el señal m/z 515.29068 con el mismo tR (5.58 min) encontrados en método polar positivo, control vs ejercicio. Esta señal corresponde al ión pseudomolecular $[M+H]^+$ 514.2836 m/z, el cual como vimos previamente, corresponde al ácido taurocólico. Luego de poder identificar el ácido taurocólico a través del análisis visual de los cromatogramas, fue esperable obtener resultados similares con una estrategia metabolómica. Sin duda, la estrategia metabolómica ha demostrado su capacidad para descubrir variables diferenciadoras que no son fácilmente detectables a simple vista, lo que aumenta su eficacia en este tipo de investigación y en la nuestra particularmente.

Otro de las señales que se repiten son m/z 408.28482 y 408.28501 a un tR de 2.11 min en método polar positivo tanto en el análisis control vs dieta, y control vs ejercicio. Para el método polar positivo, el análisis mediante volcano plot encontró el señal 532.31449 m/z, con un tR de 5.88 minutos en control vs dieta, y control vs ejercicio. Asimismo, se encontró la señal 537.27122 m/z y un tiempo de retención de 5.89 minutos en el tratamiento control vs dieta, y control vs ejercicio

En resumen, el análisis mediante Volcano Plot, para la obtención de metabolitos diferenciadores, nos entregó en la metodología polar un total

de 30 señales únicas y 6 señales que se repiten en diferentes condiciones. Por otro lado, el método semipolar identificó 6 señales únicas, mientras que el método apolar solo proporcionó 3 señales diferenciadoras.

Tabla 4.7 Recopilado de señales obtenidos mediante Análisis Metabolómico.

Condición	Metodología	Polaridad	[M+H] ⁺ / [M-H] ⁻	Metabolito	tR (min)	Fórmula	Fragmentos m/z	Compuesto
Dieta	Polar	Pos	409.29122	408.28482	2.11	C24H41O5	-	ácido haemulcólico
Dieta	Polar	Pos	576.23335	575.22695	5.58	-	-	no identificado
Dieta	Polar	Pos	426.31896	425.31169	2.13		355.0628	no identificado
Dieta	Polar	Pos	533.32089	532.31449	5.88	C30H41N6O3	126.0219; 227.1423	no identificado
Dieta	Polar	Pos	560.26122	559.25482	5.55	-	-	no identificado
Dieta	Polar	Pos	560.25844	559.25204	5.62	-	-	no identificado
Dieta	Polar	Pos	834.59712	833.59072	2.71		534.3655	PC(22:5(4Z,7Z,10Z,13Z,19Z) -O(16,17)/P-18:0)
Dieta	Polar	Pos	538.27762	537.27122	5.89	-	-	no identificado
Dieta	Polar	Pos	592.20804	591.20164	5.57	-	-	no identificado
Dieta	Polar	Pos	516.29636	515.28996	5.58	C26H46N1O7S	104.1067; 124.9979; 337.2475	ácido taurocólico
Dieta	Polar	Pos	373.27037	372.26397	3.02	-	-	no identificado
Dieta	Polar	Pos	162.02242	161.01602	11.93	-	-	no identificado
Dieta	Polar	Neg	1476.89697	1477.90337	9.78	-	-	no identificado
Dieta	Polar	Neg	534.31872	535.32512	4.67	-	-	no identificado
Dieta	Polar	Neg	202.04177	203.04817	9.41	-	-	no identificado
Dieta	Polar	Neg	283.2626	284.269	2.37	-	-	no identificado

Dieta	Polar	Neg	295.05457	296.06097	2.1	-	-	no identificado
Dieta	Polar	Neg	541.33484	542.34124	3.59	-	-	no identificado
Dieta	Polar	Neg	216.04652	217.05292	11.83	-	-	no identificado
Ejercicio	Polar	Pos	409.29141	408.28501	2.11	C24H39O5	-	ácido haemulcólico
Ejercicio	Polar	Pos	113.05718	112.05078	1.72	-	-	no identificado
Ejercicio	Polar	Pos	426.31809	425.31169	2.13	-	-	no identificado
Ejercicio	Polar	Pos	533.32089	532.31449	5.88	-	-	no identificado
Ejercicio	Polar	Pos	538.27762	537.27122	5.89	-	-	no identificado
Ejercicio	Polar	Pos	848.55088	847.54448	2.1	-	-	no identificado
Ejercicio	Polar	Pos	503.05182	502.04542	4.97	-	-	no identificado
Ejercicio	Polar	Pos	516.29708	515.29068	5.58	C26H46N1O7S	104.1067; 124.9979; 337.2475	ácido taurocólico
Ejercicio	Polar	Neg	196.94609	197.95249	1.76	-	-	no identificado
Ejercicio	Polar	Neg	322.89437	323.90077	11.94	-	-	no identificado
Ejercicio	Polar	Neg	219.10008	220.10648	12.39	-	-	no identificado
Dieta	Semipolar	Pos	538.27118	539.27758	9.77	-	-	no identificado
Dieta	Semipolar	Neg	465.96033	464.95393	2.58	-	-	no identificado
Ejercicio	Semipolar	Pos	108.90278	107.89638	11.64	-	-	no identificado
Ejercicio	Semipolar	Neg	148.98046	149.98686	3.09	-	-	no identificado
Ejercicio	Semipolar	Neg	176.90217	177.90857	1.91	-	-	no identificado
Ejercicio	Semipolar	Neg	253.14626	254.15266	9.51	-	-	no identificado
Dieta	Apolar	Neg	293.17774	294.18414	2.41	-	-	no identificado
Dieta	Apolar	Neg	443.24207	444.24847	12.04	-	-	no identificado

Ejercicio	Apolar	Neg	351.13674	352.14314	6.35	-	-	no identificado
------------------	--------	-----	-----------	-----------	------	---	---	-----------------

Capítulo 5 Discusión

Para el objetivo 1 la discusión se dio dentro de los artículos publicados, por lo cual no volveremos realizar dicha discusión. En este capítulo se discutirán los resultados obtenidos para los objetivos 2 y 3.

5.1 Efecto del extracto de calafate en modelos celulares

El efecto del extracto etanólico observado en la viabilidad de las células PC12 (Figura 4.3), a una dilución de 1:10 (85 mg/L) ya que soluciones azucaradas a igual concentraciones en las mismas proporciones del extracto no afectaron la viabilidad. Estos hallazgos respaldan la importancia de estudiar dichas sustancias para determinar el impacto biológico del extracto etanólico de calafate e identificar las biomoléculas que ejercen un rol bioactivo.

Las neuronas hipocampales expuestas al péptido A β 1-40 mostraron un aumento en la actividad espontánea de calcio, lo cual había sido observado en el estudio de Sáez-Orellana et al. (2016)¹³¹, sugiriendo que el efecto agudo del péptido A β 1-40 provoca una desregulación que conduce a un incremento en los niveles de calcio citosólico durante un periodo agudo, ya que la incubación del péptido A β durante 24 o 48 h

tiene un efecto contrario $A\beta_{1-40}$ ¹³¹. La inhibición del extracto de calafate (0.87 mg/mL) sobre la actividad espontánea de calcio sugieren que los compuestos bioactivos presentes en el extracto de calafate podrían estar involucrados en la inducción de la muerte celular a través de mecanismos aún desconocido. Diluciones mayores del extracto de calafate no tuvieron un efecto significativo en la actividad espontánea de calcio en las neuronas hipocampales. Por lo tanto, sería interesante realizar mediciones de concentraciones intermedias para evaluar si el efecto está relacionado con los compuestos bioactivos presentes en el extracto de calafate o también seleccionar algunos compuestos presentes en el extracto, para evaluar su efecto específico

5.2 Efecto del calafate y el ejercicio sobre el peso de los animales

En cuanto al efecto del calafate y el ejercicio sobre el peso de los animales de estudio (Figura 4.5,), el efecto del ejercicio es significativo, pero resulta interesante observar que en el grupo (+/+) la disminución fue mayor con respecto al grupo (-/+). Aunque los resultados no son concluyentes, el consumo de calafate pudo haber potenciado la disminución de peso generada en el grupo (+/+), principalmente por la

presencia de ácidos hidroxicinámicos, los cuales resultados previos de esta tesis, han mostrado su efecto sobre la inhibición de enzimas digestivas (artículo enviado). A pesar de que los antocianos son los principales compuestos polifenólicos presentes en el fruto, la baja absorción, rápida metabolización y eliminación en modelos animales ⁷⁵ apuntan a que los ácidos hidroxicinámicos podrían ser los compuestos polifenólicos que generarían este efecto.

Si bien el grupo que solo realiza ejercicio (-/+) no tiene una diferencia significativa con respecto a su peso inicial, si existe una clara tendencia a la baja de peso, sugiriendo que el ejercicio físico regular tiene un efecto sobre el peso de los animales en estudio, lo cual podría estar asociado a modificaciones en su metabolismo, debidos principalmente al mayor gasto energético generado con el ejercicio aeróbico regular que promueven la activación de la glicolisis aeróbica.

El grupo control (-/-) no mostró diferencias significativas en relación a su peso inicial, aunque la dispersión de los datos es muy amplia, lo que genera datos no concluyentes. El grupo de animales que solo consumió el extracto de calafate y no llevó a cabo ejercicio físico (+/-) no tuvo diferencias significativas con respecto al peso inicial, aunque se observa una leve tendencia al alza. Esto puede explicarse por la presencia de

azúcares en el extracto de calafate y la ausencia de ejercicio físico regular en este grupo de ratones.

En resumen, se observaron cambios en el peso de los animales en función del tipo de intervención llevada a cabo, como se muestra en la Figura 4.5. Estos resultados plantean preguntas sobre las posibles alteraciones metabólicas relacionadas con las variaciones en el peso corporal, y cómo podremos observarlas a través de la metabolómica. Además, es plausible que los polifenoles presentes en el extracto de calafate no sólo mitiguen los efectos de los azúcares contenidos en el mismo extracto, previniendo el aumento de peso en los animales, sino que también podrían contribuir a numerosos procesos fisiológicos, generando efectos beneficiosos para el organismo ^{132,133}.

5.3 Análisis visual de metabolitos

De forma interesante, con el análisis visual de los cromatogramas del plasma resultaron entregaron metabolitos de interés biológico, por ejemplo, en la metodóloga semipolar se identificó el ácido 3-oxodeoxicólico, el cual es un metabolito secundario de los ácidos biliares, específicamente derivado del ácido deoxicólico. El ácido deoxicólico es conocido por ser un inductor de estrés múltiple, activando

por ejemplo al factor NF- κ B, que es responsable de regular la transcripción de una amplia variedad de genes involucrados con la inmunidad y la respuesta inflamatoria y dislipidemias (Frazier et al., 2022; Payne et al., 2007).

Estudios realizados en cultivo primario de células humanas nasofaríngeas (HHPC, por sus siglas en inglés), activando a NF- κ B mediante la exposición a ácidos biliares a un pH de 4 y reportando una fuerte inhibición de los genes con función oncogénica cuando se utilizó el inhibidor farmacológico BAY-118082 (Vageli et al., 2018).

La presencia del ácido 3-oxodeoxicólico como metabolito del ácido deoxicólico respalda la efectividad de nuestro grupo control, debido a la detección de este metabolitos asociado al estrés oxidativo. Además, sugiere que tanto una dieta rica en compuestos fenólicos o ejercicio regular es una alternativa para disminuir naturalmente estos metabolitos que pueden desencadenar una respuesta inflamatoria indeseada en el organismo.

El análisis visual de los cromatogramas apolares, encontramos el ácido taurocólico, el cual es un ácido biliar conjugado (CBA por sus siglas en inglés). Los ácidos biliares conjugados poseen una mayor solubilidad

que los ácidos biliares primarios o secundario, en el organismo desarrollan diversas funciones como la emulsificación de las grasas, a través de la formación de las micelas, absorción de vitaminas liposolubles como la vitamina D, E o K, transporte de grasas a través de la circulación enterohepática y eliminación de productos de desecho como la bilirrubina. Una revisión de Ridlon y colaboradores el año 2016 asocia el ácido taurocólico con disbiosis de la microbiota intestinal y un aumento en el cáncer colonrectal ^{134,135}

En el análisis visual de los cromatogramas polares se logró identificar nuevamente al ácido taurocólico. Esto puede deberse a que el ácido taurocólico es un ácido biliar conjugado con una estructura que combina una cadena lateral hidrofílica y una porción hidrofóbica debido a su anillo esteroide (Figura 4.10), exhibe diferentes afinidades hacia las metodologías polares, semipolares y apolares utilizadas en esta tesis. Además, su comportamiento distintivo en los tres métodos cromatográficos utilizados evidencia su prometedora capacidad para ser utilizados como potencial biomarcador de un estado metabólico altamente oxidativo.

La Tabla 4.6 resume los metabolitos encontrados mediante inspección visual, entre ellos la PC(22:5(4Z,7Z,10Z,13Z,19Z)-O(16,17)/P-18:0), un

metabolito oxidado de la fosfatidilcolina. Tabla 4.6 Metabolitos plasmáticos identificados mediante inspección visual. La fosfatidilcolina es el fosfolípido más abundante en las células eucariotas. Se ha observado que un aumento en la síntesis de fosfatidilcolina y una sobreexpresión de los genes asociados a su biosíntesis están relacionados con la proliferación de células cancerosas, mientras que la inhibición de la síntesis conduce a la apoptosis de estas células^{136,137}

El análisis visual de las muestras de cerebro e hipocampo no mostraron metabolitos visualmente diferentes. Es posible que la cantidad de las muestras de cerebro e hipocampo (1.5 mg) por 430 μ L de metanol), y la naturaleza altamente lipídica de la muestra obtenida sean insuficientes para lograr una mejor calidad analítica. Por ejemplo, se ha observado que fosfolípidos cargados, sufren supresión iónica por triacilgiceroles (TAG)¹³⁸. Guan y colaboradores, utilizaron fraccionamiento previo al análisis por LC-ESI, mediante columnas de intercambio iónico para eliminar lípidos apolares que tienden a generar supresión iónica detectaron por primera vez N-acilfosfatidilserina y ácido dolicoico¹³⁸.

Con estos antecedentes, es altamente sugerible para próximos estudios metabolómicos en el cerebro o subregiones, realizar un fraccionamiento

previo para eliminar lípidos apolares que pudieran interferir en la búsqueda de metabolitos.

Estos resultados sugieren que los metabolitos de los ácidos biliares juegan un importante rol en los ratones control, en comparación a los ratones con una dieta rica en polifenoles o que realizaban ejercicio aeróbico regular.

El análisis de los cromatogramas mediante inspección visual fue una forma sencilla de abordar la búsqueda de metabolitos diferenciadores, pero es un análisis preliminar y no puede ser concluyente.

5.4 Análisis a través de la estrategia metabolómica

Los PCAs de los grupos de muestras que consumían o no calafate, mostraron que hubo dos muestras que se encontraban separadas del grupo que consumía el extracto, estas muestras corresponden a los controles negativos o (-/-), los cuales no consumieron calafate ni realizaron ejercicio aeróbico regular. Si observamos más en detalle, la tercera y/o cuarta muestra del grupo que no consumía calafate (pero si realizó ejercicio aeróbico regular) tendían a agruparse con el grupo que si consumió calafate. Esto resultó interesante, ya que podemos sugerir, que puede existir una correlación en la regulación metabólica que podría

darse tanto por el consumo de polifenoles en la dieta o el ejercicio aeróbico regular.

La análisis PCA de los grupos con ejercicio vs sin ejercicio a través de las tres metodologías sugieren que el grupo que realizó ejercicio aeróbico regular (rojo: con ejercicio) es capaz generar un grupo altamente compacto, indicando las similitudes metabólicas entre ellos. El grupo sin ejercicio (verde, n=4), tiene una distribución más amplia, lo que puede deberse a que dos de sus muestras son animales que consumieron calafate y que eso les da una diversidad metabólica más amplia y que tienden a juntar los grupos.

El análisis no supervisado a través de PCAs observado a través de los Score Plot, fue valioso para observar la distribución de las muestras y su agrupación espontánea, resaltando la necesidad de un número mayor de muestras por grupo.

Además, la redistribución de los grupos originales nos permitió obtener resultados sorprendentes en cuanto a la separación espontánea de los grupos de estudio y el efecto que tanto el extracto de calafate rico en polifenoles, o el ejercicio aeróbico regular tenían sobre el modelo de estudio

Es importante destacar que a través del análisis por Volcano Plots, la metodología polar mostró una mayor capacidad para identificar señales diferenciadoras, lo que podría estar relacionado con la naturaleza predominantemente polar de los metabolitos presentes en las muestras de plasma en estudio. Si bien la cantidad de señales diferenciadores entre los grupos de estudio es baja, es notoriamente mayor a las señales diferenciadoras encontrada mediante inspección visual.

Sorprendentemente, analitos que habíamos identificado visualmente como el ácido 3-oxodeoxicólico, no se identificaron a través de la metodología propuesta. Aunque al revisar los Loading Plots del análisis PCAs realizado a la metodología semipolar del grupo con ejercicios aeróbico regular versus el grupo sin ejercicios, la señal si se encontraban dentro de las variables con mayor peso para la separación de las muestras, pero a modo de estandarizar los resultados, no fueron incluidos

Los resultados obtenidos sugieren fuertemente, que haber forzado el grupo control con muestras de animales que no habían realizado ejercicio, pero si tuvieron una intervención nutricional, provocó que se perdieran señales importantes que podrías ser relevantes. Estos antecedentes refuerzan la necesidad de tener un número mayor de muestras para obtener resultados contundentes.

Mediante la estrategia metabolómica, fue posible identificar el ácido taucólico, el ácido haemulcólico, el cual no había sido posible identificar visualmente, y la PC(22:5(4Z,7Z,10Z,13Z,19Z)-O(16,17)/P-18:0).

Interesantemente, todos los metabolitos diferenciadores se encuentran relacionados a una disfunción oxidativa, principalmente asociadas ácidos biliares, los que se encontraron aumentados en los grupos control (Sin Calafate y Sin Ejercicio). Los ácidos biliares además de emulsificar las grasas, desempeñan un papel fundamental en las interacciones entre el huésped y la microbiota intestinal en el organismo, estudios en pacientes con Alzheimer han reportado un desbalance de los ácidos biliares y un cambio en la microbiota intestinal ¹³⁹.

Aproximadamente el 97% de los ácidos biliares primarios, como el ácido cólico y el ácido quenodesoxicólico, son reabsorbidos a través de la circulación enterohepática ¹⁴⁰. El 3% restante de los ácidos biliares escapa a la reabsorción en el íleon y continúa hacia el colon. En el colon, estos ácidos biliares son sometidos a la acción de la microbiota bacteriana, que puede transformarlos mediante reacciones de deshidroxilación y desconjugación. Como resultado, se generan ácidos biliares secundarios, como el ácido desoxicólico y el ácido litocólico,

que tienen propiedades biológicas distintas a las de los ácidos biliares primarios ^{141,142}

La notoria diferencia en los ácidos biliares presentes entre los grupos de estudios sugiere que los polifenoles en la dieta y el ejercicio físico pueden combatir el estrés oxidativo a través de diversos mecanismos, y que un cambio en la composición de la microbiota intestinal podría ser esperado ¹⁴³.

Si bien este estudio es un análisis preliminar, dado las limitaciones experimentales detalladas, y no nos permiten obtener resultados concluyentes, si evidencia que la estrategia metabolómica permitió sistematizar la información, aportar con más información que un análisis dirigido, y detectar mayores diferencias en el metaboloma de muestras obtenidas con las diferentes intervenciones, permitiendo generar nuevas hipótesis de trabajo. En nuestro estudio, a pesar del bajo número de replicas biológicas, nos permite postular una nueva hipótesis parcial podría ser:

En un modelo animal de estrés oxidativo, tanto el ejercicio aeróbico regular como una dieta rica en polifenoles lograron modular el metabolismo, que resultó en la disminución de metabolitos relacionados

con el estrés oxidativo y la regulación de vías de señalización implicadas en enfermedades crónicas asociadas a una disfunción oxidativa.

Existe un gran número de señales que aún no han sido identificadas y que están siendo estudiadas para su identificación.

Capítulo 6 Conclusiones

La caracterización química mediante HPLC-QTOF-MS/MS de 4 tipos distintos de hojas de *Berberis* autóctonos de Chile incluyendo una especie introducida, *Berberis vulgaris*, permite establecer que todas presentan un perfil de compuestos químicos complejo, pero altamente conservado respecto a los metabolitos secundarios identificados, siendo los ácidos hidroxicinámicos los metabolitos más abundantes en todas las especies estudiadas.

Los extractos metanólicos de hojas de calafate (*B. microphylla*) y de michay (*B. darwinii*) son los que presentan mayor capacidad antioxidante *in vitro*, resultados que se relacionan directamente con las altas concentraciones de compuestos fenólicos presentes en las muestras estudiadas, principalmente los HCAs, evidenciando el efecto protector que tienen los HCAs en las hojas de *Berberis* sobre el estrés oxidativo. Los resultados obtenidos sugieren fuertemente que las hojas de calafate tienen potencial uso como alimento funcional.

El extracto acuoso de hojas de Calafate, es conservado respecto al perfil metanólico, presentando solo ciertas diferencias menores producto de la distinta polaridad y energía usada para la extracción. La infusión

presentó alta capacidad antioxidante lo cual se puede relacionar con el alto contenido de compuestos fenólicos, además de presentar micronutrientes metálicos lo cual también contribuye a su potencial antioxidante.

En forma contundente se establece que la infusión no exhibe toxicidad en las células HUVEC a concentraciones inferiores a 0.83 g/L (2.34 mM), y tampoco impacta la viabilidad en las células PC12 a concentraciones menores 0.56 g/L (1.58 mM), concentraciones menores a las que es posible encontrar en el plasma, además previene la formación de ROS inducida por el H₂O₂ en células HUVEC, llegando a niveles de protección similares a la vitamina C.

La infusión presenta actividad hipoglucémica e hipolipidémica, característica demostrada mediante ensayos *in vitro* con enzimas digestivas, pudiendo ser un producto funcional que contribuya al tratamiento de Diabetes Mellitus. Por otra parte, la infusión presenta un efecto reductor de la agregación del péptido A β *in vitro*, lo que podría relacionarse a su efecto protector sobre Alzheimer, otra enfermedad con un desbalance oxidativo. Estos resultados sugieren su potencial uso como alimento funcional para promover la salud de los tejidos

neuronales y como alimento preventivo o protector en enfermedades asociadas a un estrés oxidativo.

Respecto al fruto del calafate, su extracto etanólico mostró en células PC12 que concentraciones inferiores a (8.5 mg/L) no afecta la viabilidad celular, mientras que en neuronas hipocampales tuvo un efecto inhibitorio en la actividad espontánea de calcio a concentraciones 0.87 mg/L, lo cual no puede ser asociado a los azúcares contenidos, sino más bien a los compuestos bioactivos presentes en el extracto.

Se logra establecer que utilizar animales envejecidos permite establecer un modelo de estrés oxidativo para el estudio de la intervención nutricional con calafate y/o ejercicio aeróbico regular.

La incorporación de extracto de fruto de calafate a la dieta del modelo de estudio no provocó cambios significativos en el peso de los animales. A diferencia de los animales que realizaron ejercicio aeróbico regular, en el que se observó una disminución promedio de su peso inicial, asociado a un aumento del gasto energético.

Tanto la intervención nutricional con calafate como el ejercicio generó un cambio en el metaboloma de los animales sometidos al protocolo de intervención. A pesar de que físicamente no tuvieron cambios similares

en el peso, el análisis metabolómico tanto del grupo que consumió calafate y del grupo que realizó ejercicio aeróbico regular, reporta una disminución de metabolitos asociados al estrés oxidativo, principalmente asociados a ácidos biliares, como el ácido taurocólico, el ácido haemulcólico y el ácido 3-oxodeoxicólico, reportado como un metabolito del ácido deoxicólico, todos asociados a procesos inflamatorios con desbalance oxidativo.

Por otro lado, las muestras de cerebro e hipocampo requieren de una extracción previa para eliminar lípidos neutros que interfieren en el análisis de los lípidos cargados a través de las metodologías ensayadas, por lo tanto, es este estudio no aportaron mayor información, siendo necesario su reprocesamiento analítico.

En base a estos resultados, se concluye que el modelo de estrés oxidativo, desarrollado con un grupo de animales envejecidos, fue capaz de reportar metabolitos asociados al estrés oxidativo, sugiriendo que el modelo propuesto fue altamente exitoso para nuestro estudio.

Si bien los objetivos de la tesis se han alcanzado en forma preliminar, dada la limitación en la cantidad de muestras estudiadas, siendo necesario validar de manera más sólida los resultados logrados,

requiriendo la inclusión de un mayor número de muestras en futuros estudios, se puede establecer que se cumple la hipótesis ya que el ejercicio y el consumo de extracto de calafate modificaron marcadores metabólicos asociados al estrés oxidativo y por tanto tienen un efecto positivo sobre enfermedades asociadas.

Referencias

1. Dröge, W. Free radicals in the physiological control of cell function. *Physiol Rev* **82**, 47–95 (2002).
2. Sies, H. *Oxidative stress: a concept in redox biology and medicine*. *Redox Biology* vol. 4 (Elsevier, 2015).
3. Sohal, R. S. & Orr, W. C. NIH Public Access. *Free Radic Biol Med* **52**, 539–555 (2013).
4. Martemucci, G. *et al.* Free Radical Properties, Source and Targets, Antioxidant Consumption and Health. *Oxygen* **2**, 48–78 (2022).
5. Forman, H. J. Targeting oxidative stress in disease : promise and limitations of antioxidant therapy. *Nat Rev Drug Discov* **20**, (2021).
6. Pizzino, G. *et al.* Oxidative Stress: Harms and Benefits for Human Health. *Oxid Med Cell Longev* **2017**, (2017).
7. Sies, H. Hydrogen peroxide as a central redox signaling molecule in physiological oxidative stress: Oxidative eustress. *Redox Biol* **11**, 613–619 (2017).

8. Martemucci, G. *et al.* Free Radical Properties, Source and Targets, Antioxidant Consumption and Health. *Oxygen* **2**, 48–78 (2022).
9. Gladyshev, V. N. The free radical theory of aging is dead. Long live the damage theory! *Antioxid Redox Signal* **20**, 727–731 (2014).
10. Vasdev, S. *Modulation of oxidative stress-induced changes in hypertension and atherosclerosis by antioxidants. Article in Experimental and Clinical Cardiology*
<https://www.researchgate.net/publication/51424560> (2006).
11. Dröge, W. Free radicals in the physiological control of cell function. *Physiol Rev* **82**, 47–95 (2002).
12. Gemma, C. Neuroimmunomodulation and aging. *Aging Dis* **1**, 169–172 (2010).
13. Harman, D. Aging: A Theory on Free Radical Radiation Chemistry. *J. Gerontol.* **11**, 298–300 (1956).
14. McCord, J. M. & Fridovich, I. Superoxide dismutase. An enzymic function for erythrocyte hemocuprein (hemocuprein). *J Biol Chem* **244**, 6049–55 (1969).

15. Forman, H. J. Targeting oxidative stress in disease : promise and limitations of antioxidant therapy. *Nat Rev Drug Discov* **20**, (2021).
16. Dillard, C. J., Litov, R. E., Savin, W. M., Dumelin, E. E. & Tappel, A. L. Effects of exercise, vitamin E, and ozone on pulmonary function and lipid peroxidation. *J Appl Physiol* **45**, 927–932 (1978).
17. Radak, Z., Zhao, Z., Koltai, E., Ohno, H. & Atalay, M. Oxygen consumption and usage during physical exercise: The balance between oxidative stress and ROS-dependent adaptive signaling. *Antioxid Redox Signal* **18**, 1208–1246 (2013).
18. Fernández, J. M., Silva-Grigoletto, M. E. Da & Túnez-Fiñana, I. Estrés oxidativo inducido por el ejercicio. *Rev Andal Med Deport* **2**, 19–34 (2009).
19. Alessio, H. M., Goldfarb, A. H. & Cutler, R. G. MDA content increases in fast- and slow-twitch skeletal muscle with intensity of exercise in a rat. *Am J Physiol Cell Physiol* **255**, (1988).

20. Davies, K. J. A., Quintanilha, A. T., Brooks, G. A. & Packer, L. Free radicals and tissue damage produced by exercise. *Biochem Biophys Res Commun* **107**, 1198–1205 (1982).
21. Sen, C. K., Marin, E., Kretzschmar, M. & Hanninen, O. Skeletal muscle and liver glutathione homeostasis in response to training, exercise, and immobilization. *J Appl Physiol* **73**, 1265–1272 (1992).
22. Powers, S. K. & Jackson, M. J. Exercise-Induced Oxidative Stress: Cellular Mechanisms and Impact on Muscle Force Production. *Physiol Rev* **88**, 1243–1276 (2008).
23. World Health Organization. *Informe sobre la situación mundial de la actividad física 2022*. (2016).
24. World Health Organization. *Global action plan on physical activity 2018–2030: more active people for a healthier world ISBN*. (2018).
25. Macan, A. M., Kraljević, T. G. & Raić-malić, S. Therapeutic perspective of vitamin C and its derivatives. *Antioxidants* **8**, (2019).

26. Rychter, A. M., Hryhorowicz, S., Słomski, R., Dobrowolska, A. & Krela-Kaźmierczak, I. Antioxidant effects of vitamin E and risk of cardiovascular disease in women with obesity – A narrative review. *Clinical Nutrition* **41**, 1557–1565 (2022).
27. Dao, D. Q., Ngo, T. C., Thong, N. M. & Nam, P. C. Is Vitamin A an Antioxidant or a Pro-oxidant? *Journal of Physical Chemistry B* **121**, 9348–9357 (2017).
28. González, I. N., Periago, M. J. & Alonso, F. J. G. Estimación de la ingesta diaria de compuestos fenólicos en la población española. *Revista Espanola de Nutricion Humana y Dietetica* **21**, 320–326 (2017).
29. Chamorro, M. F. *et al.* Polyphenol composition and (bio)activity of Berberis species and wild strawberry from the Argentinean Patagonia. *Molecules* **24**, 1–24 (2019).
30. Lorenzo, J. M. & Munekata, P. E. S. Phenolic compounds of green tea: Health benefits and technological application in food. *Asian Pac J Trop Biomed* **6**, 709–719 (2016).

31. Tsao, R. Chemistry and biochemistry of dietary polyphenols. *Nutrients* **2**, 1231–1246 (2010).
32. Ruiz, A. *et al.* Hydroxycinnamic acid derivatives and flavonol profiles of maqui (*Aristotelia chilensis*) fruits. *Journal of the Chilean Chemical Society* **61**, 2792–2796 (2016).
33. Ruiz, A. *et al.* Anthocyanin profiles in south Patagonian wild berries by HPLC-DAD-ESI-MS/MS. *Food Research International* **51**, 706–713 (2013).
34. Ruiz, A. *et al.* Isolation and structural elucidation of anthocyanidin 3,7- β -O- diglucosides and caffeoyl-glucaric acids from calafate berries. *J Agric Food Chem* **62**, 6918–6925 (2014).
35. Marticorena, C. & Rodriguez, R. *Flora de Chile Vol 2 (2)*. (Universidad de Concepción, 2003).
36. Martinic, M. *Los Aónikenk Historia y Cultura*. (1995).
37. Pavez, A. M. *El calafate : cuento basado en una leyenda aónikenk*. (Amanuta, 2015).

38. Ruiz, A. *et al.* Anthocyanin profiles in south Patagonian wild berries by HPLC-DAD-ESI-MS/MS. *Food Research International* **51**, 706–713 (2013).
39. Ruiz, A. *et al.* Flavonols, Alkaloids, and Antioxidant Capacity of Edible Wild Berberis Species from Patagonia. *J Agric Food Chem* **62**, 12407–12417 (2014).
40. Wicaksana, A. & Rachman, T. *Alkaloids. Angewandte Chemie International Edition*, 6(11), 951–952. vol. 3 (Springer US, 1998).
41. Zhang, Y. *et al.* Treatment of type 2 diabetes and dyslipidemia with the natural plant alkaloid berberine. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* **93**, 2559–2565 (2008).
42. Zhao, J., Wang, Z., Karrar, E., Xu, D. & Sun, X. Inhibition Mechanism of Berberine on α -Amylase and α -Glucosidase in Vitro. *Starch/Staerke* **74**, 1–9 (2022).
43. Manosalva, L. *et al.* Identification of isoquinoline alkaloids from berberis microphylla by HPLC ESI-MS/MS. *Bol Latinoam Caribe Plantas Med Aromat* **13**, 324–335 (2014).

44. Martinez, K. B., Mackert, J. D. & McIntosh, M. K. *Polyphenols and Intestinal Health. Nutrition and Functional Foods for Healthy Aging* (Elsevier Inc., 2017). doi:10.1016/B978-0-12-805376-8.00018-6.
45. Crozier, A. & Clifford, M. N. *Terpenes, Plant Secondary Metabolites. Plant Secondary Metabolites Occurrence , Structure and Role in the Human Diet* (2006). doi:10.1002/anie.200685491.
46. Marchiosi, R. *et al.* *Biosynthesis and metabolic actions of simple phenolic acids in plants. Phytochemistry Reviews* vol. 19 (2020).
47. Liu, Y. *et al.* Anthocyanin biosynthesis and degradation mechanisms in Solanaceous vegetables: A review. *Front Chem* **6**, (2018).
48. Acamovic, T. & Brooker, J. D. Biochemistry of plant secondary metabolites and their effects in animals. *Proceedings of the Nutrition Society* **64**, 403–412 (2005).
49. Heleno, S. A., Martins, A., Queiroz, M. J. R. P. & Ferreira, I. C. F. R. Bioactivity of phenolic acids: Metabolites versus parent compounds: A review. *Food Chem* **173**, 501–513 (2015).

50. Steglich, W. Plant Secondary Metabolites. Occurrence, Structure and Role in the Human Diet. Edited by Alan Crozier, M. N. Clifford and H. Ashihara. *Angewandte Chemie International Edition* **46**, 8113–8114 (2007).
51. Marchiosi, R. *et al.* Biosynthesis and metabolic actions of simple phenolic acids in plants. *Phytochemistry Reviews* vol. 19 (2020).
52. Sun, W. & Shahrajabian, M. H. Therapeutic Potential of Phenolic Compounds in Medicinal Plants—Natural Health Products for Human Health. *Molecules* **28**, (2023).
53. Martinez-Gonzalez, A. I. *et al.* Polyphenolic compounds and digestive enzymes: In vitro non-covalent interactions. *Molecules* **22**, (2017).
54. Clifford, M. N., Jaganath, I. B., Ludwig, I. A. & Crozier, A. Chlorogenic acids and the acyl-quinic acids: Discovery, biosynthesis, bioavailability and bioactivity. *Nat Prod Rep* **34**, 1391–1421 (2017).
55. Maurya, D. K., Paul, T. & Devasagayam, A. Antioxidant and prooxidant nature of hydroxycinnamic acid derivatives ferulic and

- caffeic acids. *Food and Chemical Toxicology* **48**, 3369–3373 (2010).
56. Liu, K., Luo, M. & Wei, S. The bioprotective effects of polyphenols on metabolic syndrome against oxidative stress: Evidences and perspectives. *Oxid Med Cell Longev* **2019**, (2019).
57. El-Seedi, H. R. *et al.* Biosynthesis, Natural Sources, Dietary Intake, Pharmacokinetic Properties, and Biological Activities of Hydroxycinnamic Acids. *J Agric Food Chem* **60**, 10877–10895 (2012).
58. Campa, C. Chlorogenic acids : diversity in green beans of wild coffee species. *Advances in Plant Physiology* **10**, 421–437 (2008).
59. Nova-Baza, D. *et al.* Metabolic profile and antioxidant capacity of five Berberis leaves species: A comprehensive study to determine their potential as natural food or ingredient. *Food Research International* **160**, 111642 (2022).
60. Liu, Y. *et al.* Anthocyanin biosynthesis and degradation mechanisms in Solanaceous vegetables: A review. *Front Chem* **6**, (2018).

61. Shang, Y. J., Liu, B. Y. & Zhao, M. M. Details of the antioxidant mechanism of hydroxycinnamic acids. *Czech Journal of Food Sciences* **33**, 210–216 (2015).
62. Yashin, A., Yashin, Y., Wang, J. & Nemzer, B. Antioxidant and Antiradical Activity of Coffee. *Antioxidants* **2**, 230–245 (2013).
63. Rodrigues, D. B. *et al.* Trust your gut: Bioavailability and bioaccessibility of dietary compounds. *Curr Res Food Sci* **5**, 228–233 (2022).
64. Lila, M. A., Burton-Freeman, B., Grace, M. & Kalt, W. Unraveling Anthocyanin Bioavailability for Human Health. *Annu Rev Food Sci Technol* **7**, 375–393 (2016).
65. Rodrigues, D. B. *et al.* Trust your gut: Bioavailability and bioaccessibility of dietary compounds. *Curr Res Food Sci* **5**, 228–233 (2022).
66. Kumar, N. & Goel, N. Phenolic acids: Natural versatile molecules with promising therapeutic applications. *Biotechnology Reports* **24**, e00370 (2019).

67. Ribnicky, D. M. *et al.* Effects of a high fat meal matrix and protein complexation on the bioaccessibility of blueberry anthocyanins using the TNO gastrointestinal model (TIM-1). *Food Chem* **142**, 349–357 (2014).
68. Manach, C. Polyphenols : food sources and bioavailability . *Am J Clin Nutr. American Journal of Clinical Nutrition* **79**, 727–747 (2004).
69. Williamson, G. & Clifford, M. N. Colonic metabolites of berry polyphenols: The missing link to biological activity? *British Journal of Nutrition* **104**, 48–66 (2010).
70. Williamson, G. & Clifford, M. N. Colonic metabolites of berry polyphenols: The missing link to biological activity? *British Journal of Nutrition* **104**, 48–66 (2010).
71. Egert, S., Boesch-Saadatmandi, C., Wolfram, S., Rimbach, G. & Müller, M. J. Serum lipid and blood pressure responses to quercetin vary in overweight patients by apolipoprotein E genotype. *Journal of Nutrition* **140**, 278–284 (2010).

72. Murota, K. & Terao, J. Antioxidative flavonoid quercetin: Implication of its intestinal absorption and metabolism. *Arch Biochem Biophys* **417**, 12–17 (2003).
73. Manach, C., Williamson, G., Morand, C., Scalbert, A. & Rémésy, C. Bioavailability and bioefficacy of polyphenols in humans. I. Review of 97 bioavailability studies. *Am J Clin Nutr* **81**, 230–242 (2005).
74. Prior, R. L. & Wu, X. Anthocyanins: Structural characteristics that result in unique metabolic patterns and biological activities. *Free Radic Res* **40**, 1014–1028 (2006).
75. Bustamante, L. *et al.* Pharmacokinetics of low molecular weight phenolic compounds in gerbil plasma after the consumption of calafate berry (*Berberis microphylla*) extract. *Food Chem* **268**, 347–354 (2018).
76. Olivares-Caro, L. *et al.* *Berberis microphylla* G. Forst Intake Reduces the Cardiovascular Disease Plasmatic Markers Associated with a High-Fat Diet in a Mice Model. *Antioxidants* **12**, 304 (2023).

77. Alonso, A., Marsal, S. & JuliÀ, A. Analytical Methods in Untargeted Metabolomics: State of the Art in 2015. *Front Bioeng Biotechnol* **3**, 1–20 (2015).
78. Fiehn, O. *et al.* Establishing Reporting Standards for Metabolomic and Metabonomic Studies: A Call for Participation. *OMICS* **10**, 158–163 (2006).
79. Ramsden, J. J. Metabolomics and Metabonomics. in vol. 10 1–6 (Springer London, 2009).
80. Yeung, P. Metabolomics and Biomarkers for Drug Discovery. *Metabolites* **8**, 11 (2018).
81. Enche Ady, C. N. A. *et al.* Metabolomic-guided discovery of Alzheimer’s disease biomarkers from body fluid. *Journal of Neuroscience Research* vol. 95 2005–2024 Preprint at <https://doi.org/10.1002/jnr.24048> (2017).
82. Alonso, A., Marsal, S. & JuliÀ, A. Analytical Methods in Untargeted Metabolomics: State of the Art in 2015. *Front Bioeng Biotechnol* **3**, 1–20 (2015).

83. Gromski, P. S. *et al.* A tutorial review: Metabolomics and partial least squares-discriminant analysis - a marriage of convenience or a shotgun wedding. *Anal Chim Acta* **879**, 10–23 (2015).
84. Worley, B. & Powers, R. Multivariate Analysis in Metabolomics. *Curr Metabolomics* **1**, 92–107 (2012).
85. Theodoridis, G., Gika, H. G. & Wilson, I. D. Mass spectrometry-based holistic analytical approaches for metabolite profiling in systems biology studies. *Mass Spectrom Rev* **47**, n/a-n/a (2011).
86. Yin, P., Lehmann, R. & Xu, G. Effects of pre-analytical processes on blood samples used in metabolomics studies. *Anal Bioanal Chem* **407**, 4879–4892 (2015).
87. Dettmer, K., Aronov, P. A. & Hammock, B. D. Mass spectrometry-based metabolomics. *Mass Spectrom Rev* **26**, 51–78 (2007).
88. Liebeke, M. *et al.* *Mass Spectrometry in Metabolomics. Nature methods* vol. 1198 (Springer New York, 2014).
89. Sumner, L. W. *et al.* Proposed minimum reporting standards for chemical analysis: Chemical Analysis Working Group (CAWG)

- Metabolomics Standards Initiative (MSI). *Metabolomics* **3**, 211–221 (2007).
90. Arapitsas, P. *et al.* Wine metabolomics reveals new sulfonated products in bottled white wines, promoted by small amounts of oxygen. *J Chromatogr A* **1429**, 155–165 (2016).
 91. Sumner, L. W. *et al.* Proposed minimum reporting standards for chemical analysis Chemical Analysis Working Group (CAWG) Metabolomics Standards Initiative (MSI). *Metabolomics* **3**, 211–221 (2007).
 92. Ruiz, A. *et al.* Analysis of hydroxycinnamic acids derivatives in calafate (*Berberis microphylla* G. Forst) berries by liquid chromatography with photodiode array and mass spectrometry detection. *J Chromatogr A* **1281**, 38–45 (2013).
 93. Singleton, V. L., Rossi Jr., J. A., Rossi J A Jr. & Rossi, J. A. Colorimetry of Total Phenolics with Phosphomolybdic-Phosphotungstic Acid Reagents. *Am J Enol Vitic* **16**, 144 LP – 158 (1965).

94. Roura, E., Andrés-Lacueva, C., Estruch, R. & Lamuela-Raventós, R. M. Total Polyphenol Intake Estimated by a Modified Folin–Ciocalteu Assay of Urine. *Clin Chem* **52**, 749–752 (2006).
95. Özyürek, M. *et al.* A comprehensive review of CUPRAC methodology. *Analytical Methods* **3**, 2439 (2011).
96. Floegel, A., Kim, D. O., Chung, S. J., Koo, S. I. & Chun, O. K. Comparison of ABTS/DPPH assays to measure antioxidant capacity in popular antioxidant-rich US foods. *Journal of Food Composition and Analysis* **24**, 1043–1048 (2011).
97. Ou, B., Chang, T., Huang, D. & Prior, R. L. Determination of total antioxidant capacity by oxygen radical absorbance capacity (ORAC) using fluorescein as the fluorescence probe: First action 2012.23. *JAOAC Int* **96**, 1372–1376 (2013).
98. Wu, X. *et al.* Lipophilic and Hydrophilic Antioxidant Capacities of Common Foods in the United States. *J Agric Food Chem* **52**, 4026–4037 (2004).

99. Calder, P. C. Omega-3 polyunsaturated fatty acids and inflammatory processes: nutrition or pharmacology? *Br J Clin Pharmacol* **75**, 645–662 (2013).
100. Calder, P. C. Functional Roles of Fatty Acids and Their Effects on Human Health. *Journal of Parenteral and Enteral Nutrition* **39**, 18S-32S (2015).
101. Thurnhofer, S. & Vetter, W. A gas chromatography/electron ionization-mass spectrometry-selected ion monitoring method for determining the fatty acid pattern in food after formation of fatty acid methyl esters. *J Agric Food Chem* **53**, 8896–8903 (2005).
102. Olivares-Caro, L. *et al.* Berberis microphylla G. Forst (Calafate) Berry Extract Reduces Oxidative Stress and Lipid Peroxidation of Human LDL. *Antioxidants* **9**, 1171 (2020).
103. Charan, J. & Kantharia, N. How to calculate sample size in animal studies? *J Pharmacol Pharmacother* **4**, 303 (2013).
104. Cardoso, F. dos S. *et al.* Aerobic exercise reduces hippocampal ERK and p38 activation and improves memory of middle-aged rats. *Hippocampus* **27**, 899–905 (2017).

105. Özgünseven, A. *et al.* Alpha-glucosidase and tyrosinase inhibition of polyphenols isolated from *Potentilla speciosa* var. *speciosa*: In vitro and in silico perspectives. *Ind Crops Prod* **170**, (2021).
106. Pizzino, G. *et al.* Oxidative Stress: Harms and Benefits for Human Health. *Oxid Med Cell Longev* **2017**, (2017).
107. Sohal, R. S. & Orr, W. C. The redox stress hypothesis of aging. *Free Radic Biol Med* **52**, 539–555 (2012).
108. Gomez-Cabrera, M. C., Salvador-Pascual, A., Cabo, H., Ferrando, B. & Vina, J. Redox modulation of mitochondriogenesis in exercise. Does antioxidant supplementation blunt the benefits of exercise training? *Free Radic Biol Med* **86**, 37–46 (2015).
109. Sies, H. Hydrogen peroxide as a central redox signaling molecule in physiological oxidative stress: Oxidative eustress. *Redox Biol* **11**, 613–619 (2017).
110. Dauncey, M. J. Nutrition, Genes, and Neuroscience. in *Diet and Exercise in Cognitive Function and Neurological Diseases* 1–13 (John Wiley & Sons, Inc, 2015). doi:10.1002/9781118840634.ch1.

111. Schwingshackl, L., Morze, J. & Hoffmann, G. Mediterranean diet and health status: Active ingredients and pharmacological mechanisms. *Br J Pharmacol* **177**, 1241–1257 (2020).
112. Ruiz, A. *et al.* Polyphenols and Antioxidant Activity of Calafate (*Berberis microphylla*) Fruits and Other Native Berries from Southern Chile. *J Agric Food Chem* **58**, 6081–6089 (2010).
113. Ruiz, A. *et al.* Flavonols, Alkaloids, and Antioxidant Capacity of Edible Wild *Berberis* Species from Patagonia. *J Agric Food Chem* **62**, 12407–12417 (2014).
114. Wang, K., Feng, X., Chai, L., Cao, S. & Qiu, F. The metabolism of berberine and its contribution to the pharmacological effects. *Drug Metabolism Reviews* vol. 49 139–157 Preprint at <https://doi.org/10.1080/03602532.2017.1306544> (2017).
115. Zhang, M., Yang, H., Yang, E., Li, J. & Dong, L. Berberine Decreases Intestinal GLUT2 Translocation and Reduces Intestinal Glucose Absorption in Mice. *Int J Mol Sci* **23**, (2022).

116. SIES, H. Oxidative Stress: Introductory Remarks. in *Oxidative Stress* 1–8 (Elsevier, 1985). doi:10.1016/b978-0-12-642760-8.50005-3.
117. Powers, S. K. *et al.* Exercise-induced oxidative stress: Friend or foe? *J Sport Health Sci* **9**, 415–425 (2020).
118. Gaitán, J. M. *et al.* Effects of Aerobic Exercise Training on Systemic Biomarkers and Cognition in Late Middle-Aged Adults at Risk for Alzheimer’s Disease. *Front Endocrinol (Lausanne)* **12**, (2021).
119. Gika, H. & Theodoridis, G. Sample preparation prior to the LC–MS-based metabolomics/metabonomics of blood-derived samples. *Bioanalysis* **3**, 1647–1661 (2011).
120. Newsom, S. N. & McCall, L. I. Metabolomics: Eavesdropping on silent conversations between hosts and their unwelcome guests. *PLoS Pathog* **14**, (2018).
121. Saigusa, D. *et al.* Establishment of Protocols for Global Metabolomics by LC-MS for Biomarker Discovery. *PLoS One* **11**, e0160555 (2016).

122. Castillo, C. *et al.* Neuroprotective effects of EpoL against oxidative stress induced by soluble oligomers of A β peptide. *Redox Biol* **24**, 101187 (2019).
123. Bustamante Salazar, L. A. Desarrollo de una plataforma analítica para el estudio de compuestos (poli) fenólicos en frutos de uva , calafate y para metabolómica en plasma de animales de experimentación sometidos a la ingesta aguda de un extracto de fruto. (2017).
124. Cardoso, F. dos S. *et al.* Aerobic exercise reduces hippocampal ERK and p38 activation and improves memory of middle-aged rats. *Hippocampus* **27**, 899–905 (2017).
125. Curtasu, M. V. *et al.* Obesity Development in a Miniature Yucatan Pig Model: A Multi-compartmental Metabolomics Study on Cloned and Normal Pigs Fed Restricted or Ad Libitum High-Energy Diets. *J Proteome Res* **18**, 30–47 (2019).
126. Laursen, M. R. *et al.* Untargeted metabolomics reveals a mild impact of remote ischemic conditioning on the plasma metabolome and α -hydroxybutyrate as a possible cardioprotective factor and biomarker of tissue ischemia. *Metabolomics* **13**, 67 (2017).

127. Alseekh, S. *et al.* Mass spectrometry-based metabolomics: a guide for annotation, quantification and best reporting practices. *Nat Methods* **18**, 747–756 (2021).
128. Sáez-Orellana, F. *et al.* ATP leakage induces P2XR activation and contributes to acute synaptic excitotoxicity induced by soluble oligomers of β -amyloid peptide in hippocampal neurons. *Neuropharmacology* **100**, 116–123 (2016).
129. Patterson, R. E., Ducrocq, A. J., McDougall, D. J., Garrett, T. J. & Yost, R. A. Comparison of blood plasma sample preparation methods for combined LC-MS lipidomics and metabolomics. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci* (2015) doi:10.1016/j.jchromb.2015.08.018.
130. Mastrangelo, A., Ferrarini, A., Rey-Stolle, F., García, A. & Barbas, C. From sample treatment to biomarker discovery: A tutorial for untargeted metabolomics based on GC-(EI)-Q-MS. *Anal Chim Acta* **900**, 21–35 (2015).
131. Sáez-Orellana, F. *et al.* ATP leakage induces P2XR activation and contributes to acute synaptic excitotoxicity induced by soluble

- oligomers of β -amyloid peptide in hippocampal neurons. *Neuropharmacology* **100**, 116–123 (2016).
132. Liu, K., Luo, M. & Wei, S. The bioprotective effects of polyphenols on metabolic syndrome against oxidative stress: Evidences and perspectives. *Oxid Med Cell Longev* **2019**, (2019).
133. Zhang, H. & Tsao, R. Dietary polyphenols, oxidative stress and antioxidant and anti-inflammatory effects. *Curr Opin Food Sci* **8**, 33–42 (2016).
134. Gao, Z., Guo, B., Gao, R., Zhu, Q. & Qin, H. Microbiota disbiosis is associated with colorectal cancer. *Front Microbiol* **6**, 1–9 (2015).
135. Ridlon, J. M., Wolf, P. G. & Gaskins, H. R. Taurocholic acid metabolism by gut microbes and colon cancer. *Gut Microbes* **7**, 201–215 (2016).
136. Ridgway, N. D. The role of phosphatidylcholine and choline metabolites to cell proliferation and survival. *Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology* vol. 48 20–38 Preprint at <https://doi.org/10.3109/10409238.2012.735643> (2013).

137. Cai, H. *et al.* Serum Metabolomics Analysis for Biomarkers of *Lactobacillus plantarum* FRT4 in High-Fat Diet-Induced Obese Mice. *Foods* **11**, (2022).
138. Guan, Z. Discovering novel brain lipids by liquid chromatography/tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography B: Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences* vol. 877 2814–2821 Preprint at <https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2009.03.002> (2009).
139. Mulak, A. Bile Acids as Key Modulators of the Brain-Gut-Microbiota Axis in Alzheimer’s Disease. *Journal of Alzheimer’s Disease* vol. 84 461–477 Preprint at <https://doi.org/10.3233/JAD-210608> (2021).
140. Hofmann, A. F. & Hagey, L. R. Key discoveries in bile acid chemistry and biology and their clinical applications: History of the last eight decades. *J Lipid Res* **55**, 1553–1595 (2014).
141. Ridlon, J. M., Wolf, P. G. & Gaskins, H. R. Taurocholic acid metabolism by gut microbes and colon cancer. *Gut Microbes* **7**, 201–215 (2016).

142. Devlin, A. S. & Fischbach, M. A. A biosynthetic pathway for a prominent class of microbiota-derived bile acids. *Nat Chem Biol* **11**, 685–690 (2015).
143. Monda, V. *et al.* Exercise modifies the gut microbiota with positive health effects. *Oxid Med Cell Longev* **2017**, (2017).