



UCSC

MOB|UCSC
Magíster en Ciencias Biomédicas UCSC



**Facultad de
Medicina**

Universidad Católica de la Santísima Concepción

FACULTAD DE MEDICINA

UNIVERSIDAD CATÓLICA DE LA SANTÍSIMA CONCEPCIÓN

**EFFECTOS ANTIADIPOGÉNICOS, ANTIDIABÉTICOS Y
ANTIOXIDANTES DE COMPUESTOS BIOACTIVOS DEL
COCHAYUYO (*Durvillaea antarctica*)**

POR:

Carolina Torres Oliva

TESIS PARA OPTAR AL GRADO DE MAGÍSTER EN CIENCIAS BIOMÉDICAS

Tutor: Dr. Marcelo Villagrán Orellana
Departamento de Ciencias Básicas y Morfología
Facultad de Medicina
Universidad Católica de la Santísima Concepción

Cotutor: Dr. Ariel Ávila Macaya
Departamento de Ciencias Básicas y Morfología
Facultad de Medicina
Universidad Católica de la Santísima Concepción

Evaluador externo: Dr. Miquel Martorell Pons
Departamento de Nutrición y Dietética
Facultad de Farmacia
Universidad de Concepción

Evaluador interno: Dr. Matias Hepp Castro
Departamento de Ciencias Básicas y Morfología
Facultad de Medicina
Universidad Católica de la Santísima Concepción

Concepción, Chile

2023

*We are the champions, my friends
And we'll keep on fighting till the end*

Freddie Mercury

Agradecimientos

A mi tutor de tesis, Dr. Marcelo Villagrán, por su paciencia, compromiso y buena voluntad para sacar adelante este proyecto de tesis, y, además, apoyarme incondicionalmente durante este proceso y compartir sus conocimientos de manera amplia en mi formación de postgrado.

A mi co-tutor de tesis, Dr. Ariel Ávila, por su aporte generoso en conocimientos y recursos en el desarrollo de esta tesis asociados al proyecto de FIAEC 01/2021, que contribuyó el trabajo con animales.

A los revisores Dr. Miquel Martorell y Dr. Matias Hepp, por su crítica constructiva y su generosidad para compartir ideas y conocimiento en el desarrollo de este proyecto de tesis

A la Dra. Lorena Mardones, por su apoyo en la realización de actividades de la tesis, su crítica constructiva y aportes de conocimiento muy relevantes para este proyecto.

A la Dra. Carolina Aguirre, por aportar el extracto e infusión de *Durvillaea antarctica*, para el desarrollo de la presente tesis.

A la Vicerrectoría de Investigación y Postgrado, y a la Dirección de Postgrado de la Universidad Católica de la Santísima Concepción, por sus aportes económicos para llevar a cabo actividades asociadas a la presente investigación.

A mi madre Úrsula y mi abuela Juanita por entregarme el amor y las herramientas necesarias para alcanzar las estrellas más altas. A mi pareja, Nicolás por su paciencia y amor incondicional. A mis tíos, primas, sobrino y amigas por confiar en mis capacidades y apoyarme constantemente.

Resumen

Las algas pardas se caracterizan por un alto contenido de compuestos bioactivos con potencial antidiabético, antioxidante y antiadipogénico. Lo anterior se ha demostrado para algas asiáticas como *Ecklonia cava*, que destacan por su alto contenido en florotaninos. Sin embargo, son escasos los estudios para algas disponibles en costas chilenas como el cochayuyo (*Durvillaea antarctica*). En esta tesis se estudiaron los efectos biológicos de un extracto acuoso de *D. antarctica* (EAq) sobre preadipocitos 3T3-L1, ratones BALB/c y en voluntarios humanos a través de un ensayo randomizado cruzado. En el modelo de preadipocitos el EAq no provocó efectos citotóxicos a la concentración máxima de exposición de 40 mg/mL, pero sí indujo una reducción del 60 % en la tasa de proliferación. Además, el EAq logró recuperar en un 40% la viabilidad celular luego del estrés oxidativo inducido con 0,1 mM de H₂O₂, a través del mantenimiento de la cadena respiratoria mitocondrial y la integridad de la membrana lisosomal. El EAq no logró proteger frente a la adiposidad y a alteraciones metabólicas inducidas por una dieta alta en grasa administrada por 10 semanas a ratones BALB/c adultos, incluyendo falta de protección frente a: ganancia ponderal, acumulación tejido adiposo epididimal, aumento de colesterol total, aumento de triglicéridos, aumento de la peroxidación lipídica e intolerancia a la glucosa. Sin embargo, la ingesta de una infusión de *D. antarctica* logró reducir en un 20% la respuesta glicémica al pan blanco en un ensayo randomizado cruzado realizado en 14 voluntarios. Se requieren futuros estudios con diversas dosis y vías de administración del extracto en modelos animales para explorar el potencial protector de compuestos bioactivos de *D. antártica* frente a enfermedades cardiometabólicas.

Índice General

1. Introducción.....	8
1.1 Aspectos generales de las algas y su consumo	8
1.2 Algas como fuente alimentaria	11
1.2.1 Macronutrientes en las algas.....	11
1.2.2 Micronutrientes en las algas	13
1.2.3 Compuestos bioactivos presentes en las algas	15
1.3 Efectos de extractos de algas marinas en enfermedades no transmisibles	16
2. Hipótesis	21
3. Objetivos.....	21
3.1 Objetivo general.....	21
3.2 Objetivos específicos	21
4. Materiales y Métodos	22
4.1 Ensayos en modelo de preadipocitos	22
4.1.1 Cultivo de células 3T3-L1	22
4.1.2 Ensayos de viabilidad celular	22
4.1.3 Ensayos de proliferación celular	22
4.1.4 Inducción de estrés oxidativo con peróxido de hidrógeno (H ₂ O ₂).....	22
4.1.5 Protección del extracto frente a estrés oxidativo inducido por H ₂ O ₂	23
4.2 Exposición de ratones a extracto de <i>D. antarctica</i>	23
4.2.1 Mantenimiento de animales	23
4.2.2 Protocolo de tratamientos	23
4.2.3 Determinaciones en los animales.....	24
4.3 Determinaciones de metabolitos por métodos espectrofotométricos	25
4.3.1 Colesterol total en suero	25
4.3.2 Triglicéridos en suero.....	25
4.3.3 Colesterol LDL en suero.....	25
4.3.4 Glucosa en orina	25
4.3.5 Proteínas totales en orina	26

4.3.6 Creatinina en orina.....	26
4.3.7 Urea en orina.....	26
4.3.8 Transaminasa hepática GOT en suero.....	26
4.3.9 Determinación de TBARS (sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico)	27
4.4 Estudio randomizado cruzado para efecto agudo del cochayuyo	27
4.4.1. Participantes del estudio	27
4.4.2 Preparación de la infusión de cochayuyo.....	27
4.4.3 Determinación de la respuesta glicémica a carbohidratos complejos.	28
4.5 Análisis estadístico	28
5. Resultados.....	29
5.1 Efecto de extracto de <i>Durvillaea antarctica</i> en modelo de pre-adipocitos.	29
5.1.1 Obtención de extracto acuoso de <i>Durvillaea antarctica</i>	29
5.1.2 Efecto de extracto sobre viabilidad y proliferación de preadipocitos.	30
5.1.3 Potencial protector del extracto frente a estrés oxidativo inducido por peróxido de hidrógeno.	31
5.2 Efectos metabólicos del extracto en ratones BALB/c	34
5.2.1 Ajuste inicial de la dosis administrada a los ratones	34
5.2.2 Efecto del extracto sobre peso corporal y adiposidad.....	35
5.2.3 Ingesta de energía y macronutrientes.....	37
5.2.4 Efecto del extracto sobre lípidos plasmáticos	39
5.2.5 Efecto del extracto sobre metabolismo glucídico.	40
5.2.6 Efecto de extracto sobre TBARS en suero.....	42
5.3 Efecto agudo de infusión de <i>Durvillaea antarctica</i> sobre metabolismo de carbohidratos complejos.	43
6. Discusión	46
6.1 Efecto del extracto acuoso de <i>Durvillaea antarctica</i> en modelo celular de preadipocito.	46
6.2 Efectos del extracto acuoso de <i>Durvillaea antarctica</i> en ratones BALB/c adultos.....	49
6.3 Efecto de infusión de <i>Durvillaea antártica</i> sobre respuesta glicémica postprandial a carbohidratos ..	55
7. Conclusiones.....	58
8. Referencias Bibliográficas.....	59

Índice de figuras

Figura 1. Procedimiento de obtención de extracto.....	29
Figura 2. Respuesta celular Línea 3T3-L1 en presencia de extracto de <i>D. antarctica</i>	30
Figura 3. Estrés oxidativo inducido por peróxido de hidrógeno (H ₂ O ₂) en presencia de extracto de <i>D. antarctica</i>	31
Figura 4. Actividad metabólica en estrés oxidativo inducido por H ₂ O ₂ en presencia de extracto de <i>D. antarctica</i>	33
Figura 5. Efectos del extracto de <i>D. antarctica</i> en parámetros de peso corporal y tejido adiposo epididimal por condición experimental.....	36
Figura 6. Ingesta total de alimento, energía y macronutrientes por condición experimental.....	38
Figura 7. Niveles de lípidos en suero por condición experimental.....	39
Figura 8. Indicadores de metabolismo glucídico por condición experimental.....	41
Figura 9. Determinación de sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico (TBARS) en suero por condición experimental.....	42
Figura 10. Procedimiento de estudio randomizado cruzado.....	43
Figura 11. Efecto agudo de infusión de cochayuyo sobre metabolismo de carbohidratos complejos.....	45

Índice de tablas

Tabla 1. Efectos de extractos de algas marinas en enfermedades no transmisibles.....	19
Tabla 2. Caracterización de extracto de <i>D. antarctica</i>	29
Tabla 3. Resultados de análisis de muestras de suero y orina de ratones balb/c.....	34
Tabla 4. Características generales de los participantes del estudio randomizado cruzado.....	44

1. Introducción

En Chile existe una alta tasa de obesidad en la población, una prevalencia que posiciona dentro de los 10 países con más obesidad a nivel mundial. De acuerdo con cifras de la Organización para la Cooperación y el Desarrollo Económicos (OCDE), el 34,4% en la población mayor de 15 años padece obesidad en Chile, ocupando el segundo lugar de los países con mayor prevalencia de esta patología (Martínez-Sanguinetti *et al*, 2020). En concordancia a esto, según la última Encuesta Nacional de Salud 2016-2017 (ENS 2016-2017), el 25,5 % de las personas mayores de 20 años, padece alto riesgo de presentar un evento cardiovascular, y además se muestra un incremento en los factores de riesgo que propician la aparición de enfermedades no transmisibles (ENT), siendo los estilos de vida poco saludables y particularmente la mala alimentación, los de mayor incidencia para el desarrollo de esas patologías. La diabetes Mellitus tipo 2 (DM2) representa alrededor del 70% de las muertes por enfermedades cardiovasculares a nivel nacional, y en concordancia con la ENS 2016-2017, el 12,3% de la población la padece, lo que es equivalente a 1,7 millones de habitantes en el país (Subsecretaria de Salud Pública, 2017). La DM2, es causal de múltiples complicaciones tanto micro como macrovasculares cuando no existe un control metabólico adecuado, en particular de las condiciones de hiperglicemia, por lo que se hace relevante conocer compuestos bioactivos y sus mecanismos de acción para mejorar las estrategias de prevención y tratamiento la DM2 (Baeza M y Cuadrado A, 2021). Los patrones de alimentación occidental priorizan el consumo de alimentos ultraprocesados con alta densidad energética y nutricionalmente deficientes y en conjunto a la adopción del sedentarismo, desencadena la aparición de ENT y por consiguiente el deterioro de la calidad de vida (OPS y OMS, 2021). Por ello, llevar un estilo de vida saludable, supone un factor protector frente a estas patologías, y en este se considera una alimentación saludable que debe ser balanceada, variada y contener todos los nutrientes para mantenerse sano y evitar cualquier tipo de malnutrición, ya sea por déficit o por exceso (OMS, 2020). En este sentido, es primordial caracterizar alimentos de bajo procesamiento, para comprender los beneficios para la salud asociados a su consumo e identificar la existencia de compuestos bioactivos capaces de prevenir y/o mejorar condiciones asociadas a ENT.

1.1 Aspectos generales de las algas y su consumo

Las algas son organismos vegetales que obtienen sus nutrientes a través de la fotosíntesis (autótrofos). Habitan ambientes marinos en su mayoría, aunque también pueden encontrarse en masas de agua dulce, formando grandes comunidades similares a bosques en los cuales proporcionan hábitat y alimento para muchos organismos que forman parte del océano. Estos vegetales marinos, se pueden clasificar por su tamaño en microalgas y macroalgas. Las primeras, tienen tamaños milimétricos o de algunos centímetros, mientras que las segundas pueden alcanzar entre 50 y 70 metros de largo. Conjuntamente, las macroalgas tienen pigmentaciones variables que hacen posible su subclasificación en algas verdes (*Chlorophytas*), algas rojas (*Rhodophytas*) y algas pardas o marrones (*Phaeophytas*). Las algas verdes tienen como pigmentos principales la clorofila a y b, que otorgan su color característico, y además contienen cantidades menores de xantófilas

(luteína, violaxantina, neoxantina y enteroxantina) y β - caroteno. Las algas rojas que contienen una gran cantidad de ficoeritrina y ficocianinas (ficobiliproteínas) que confieren su color rojizo, y en menor cantidad clorofilas a y d. Las algas pardas deben su coloración marrón a la mayor presencia de la xantofila fucoxantina, aunque también posee otros pigmentos en menor proporción como la clorofila a y c, y β - caroteno. (Freitas *et al*, 2021; Figueroa *et al*, 2021) Por otra parte, se distinguen dos tipos de algas en lo relativo a las condiciones de su hábitat: las planctónicas y las bentónicas. Las algas planctónicas, son aquellas que viven suspendidas sobre la masa de agua y suelen ser comúnmente microalgas ya que su pequeño tamaño les permite mantenerse a flote y les otorga un espacio suficiente para el intercambio de nutrientes y gases. Las algas bentónicas, en tanto, son aquellas que se encuentran adheridas a un sustrato sólido como roqueros, pudiendo ser micro o macroalgas, sin embargo, estas últimas son las más notorias y suelen ser características de ambientes marinos. (Bellorín, 2022; Quitral *et al*, 2019; Tala, 2017) Estas plantas acuáticas se encuentran en la tierra hace 3.500 millones de años, y han formado parte de la alimentación de habitantes de zonas costeras de todo el mundo desde la antigüedad, destacando países como China, Japón y Corea, que son grandes consumidores de ellas hasta la fecha. Coincidentemente, Chile comparte este consumo milenario, el cual ha sido comprobado gracias a hallazgos de restos de humanos y alimentos que datan de 14.500 a 18.000 años en el sitio arqueológico de Monte Verde, el asentamiento humano más antiguo de América, localizado en la Región de los Lagos. Allí se encontraron restos de algas presumiblemente utilizadas como alimentos, fertilizantes, forraje para animales o con fines ceremoniales por los pueblos originarios de Chile (Montecino *et al*, 2012; Dillehay *et al*, 2008; FIA, 2016).

En los 6.000 km de costa chilena, se pueden encontrar alrededor de 800 especies de algas marinas, sin embargo pocas son conocidas ampliamente. Entre 2012 y 2020, Chile fue el principal productor de algas en América con una producción promedio de 403.608 ± 75.344 toneladas, lo cual es superior a lo reportado para Europa, África y Oceanía. (FAO, 2018; Bonanno y Orlando-Bonaca, 2018) Sin embargo, la mayoría de las algas, son exportadas a Europa y Asia, siendo un 97% usadas en producción de geles para uso en cosmética, fármacos y como aditivos alimentarios hidrocoloides (agar, alginato, carragenanos). Dentro de las especies de algas más conocidas y con un mayor consumo alimentario en el país, destaca *Durvillaea antarctica*, cuyo nombre popular “cochayuyo”, proviene de las palabras en quechua *Kocha* (laguna) y *Yuyu* (hortaliza) (Real Academia Española, 2022). Se clasifica como una macroalga bentónica que alcanza los 15 metros de largo y de 20 a 30 centímetros de ancho y se puede encontrar en la costa chilena desde la región de Coquimbo (30° 55' LS) hasta Cabo de Hornos (55° LS). Cabe destacar que recientemente se ha reportado una nueva especie de cochayuyo, denominada *Durvillaea incurvata* la cual es morfológicamente igual a *D. antarctica*, pero difiere en su genética, y se presenta desde el norte de Chile hasta las islas Guaitecas de la región de Aysén. Los datos de Sernapesca, destacan la extracción de *Durvillaea antarctica* en la región del Bío Bío, con 4.682 toneladas de alga seca en el año 2021, de la cual una parte minoritaria es destinada al consumo humano en diferentes preparaciones, tales como: guisos, charquicanes, sopas y ensaladas, mientras que en mayor proporción es exportada a países asiáticos. (SERNAPESCA, 2021; Universidad Arturo Prat, 2014; Macaya-Horta, 2022; Fraser *et al*, 2019). Aunque existen otras algas comestibles en Chile como: *Pyropia* (luche), *Agarophyton chilense* (pelillo), *Ulva*

Lactuca (lechuga de mar), *Chondracanthus chamissoi* (chicorea de mar) y *Macrocystis pyriphera* (Huiro); *Durvillaea antarctica* es la más consumida a nivel nacional (Tala, 2017; Pinto *et al*, 2021). A pesar de la gran disponibilidad de algas, el consumo de este alimento por parte de la población es menor a 200 gramos anuales per cápita. lo cual contrasta con el consumo 20 veces mayor de países en países asiáticos como China, Japón y Corea, el cual asciende a los 4 kg anuales per cápita. El bajo consumo nacional de algas se atribuye a sus características organolépticas particulares. Sin embargo, distintas investigaciones han buscado promover su consumo a través de la utilización de las algas en diferentes preparaciones como hamburguesas, esto se justifica por la excelente calidad nutricional de las algas, caracterizada por una gran variedad de macro y micronutrientes, además de compuestos bioactivos. (Figuerola *et al*, 2022; SUBPESCA, 2021; Zava y Zava, 2011; Murai *et al*, 2019). La relevancia de estos valores radica en la inclusión de algas en la alimentación diaria de los habitantes asiáticos, y como esto podría repercutir en parámetros de salud mencionados, lo que sugiere que el consumo habitual de algas representa un factor protector relacionado a factores de riesgo para el desarrollo de enfermedades crónicas no transmisibles y/o una alternativa terapéutica para promover el control de ciertas alteraciones metabólicas.

A este consumo, se atribuyen beneficios para la salud asociados a sus componentes nutricionales en parámetros de salud medibles cuantitativamente tales como lípidos sanguíneos, niveles de glicemia, presión arterial y peso corporal en animales y humanos. En el caso de la población japonesa, la mortalidad por enfermedad cardiaca isquémica es la más baja del mundo, lo que estaría asociado a la ingesta dietaria de algas y el control que esta podría ejercer en la disminución en la presión arterial y los lípidos en suero. Estudios han señalado la relación inversa entre la ingesta recurrente de algas y la mortalidad por infartos, en este sentido la población que consumía algas de manera diaria tenía un menor riesgo de mortalidad por infartos, especialmente en aquellos cerebrales, además de tener un impacto positivo en la reducción del riesgo de accidente cerebrovascular (ACV), en hombres (Chichibu *et al*, 2021). Mientras que, en mujeres se observó una relación inversa entre la ingesta frecuente de algas y la mortalidad por ACV total e infarto cerebral (Kishida *et al*, 2020). Además se ha evidenciado que la ingesta de algas en la dieta tradicional japonesa reduce el riesgo de enfermedad coronaria entre hombres y mujeres (Murai *et al*, 2019) . Los mecanismos de acción de las algas sobre estos marcadores no están completamente estudiados, sin embargo, se atribuye su actuar a los compuestos bioactivos presentes en las mismas. Con estos antecedentes, es posible comprender que la menor mortalidad existente en la población japonesa podría estar relacionada a sus patrones alimentarios, ya que de acuerdo con los indicadores de OCDE 2021, Japón posee tasas más bajas de mortalidad que países americanos como Chile. En particular se hace referencia a las enfermedades del sistema circulatorio como las principales causas de muerte, siendo responsables de 1 de cada 3 muertes en cada país, en que se incluyen los infartos y los ACV, que tienen una ocurrencia menor a mayor ingesta de algas según los estudios previamente descritos. Conjuntamente, la obesidad o sobrepeso en la población japonesa es inferior al 35%, mientras que en países occidentales como Chile, esta cifra superaría el 70% de acuerdo a la OCDE, lo cual favorece el desarrollo de enfermedades no transmisibles como las enfermedades cardiovasculares, las que representan las principales causas de muerte en nuestro país, donde destacan los ACV de manera específica.(Murai *et al*, 2020; OCDE, 2019) Por este motivo,

la incorporación de algas marinas como alimentos, así como también a través de extractos provenientes de las mismas, suponen beneficios dentro de la salud cardiovascular de la población, que implicaría una mejora en la calidad y esperanza de vida al reducir el riesgo de desarrollo de enfermedades que resultan fatales como es el caso de las cardiopatías, además de enfermedades metabólicas asociadas a estados nutricionales alterados y estilos de vida poco saludables.

1.2 Algas como fuente alimentaria

Las algas son alimentos de alto valor nutricional y completos, pues son una buena fuente de nutrientes como proteínas, lípidos, fibra dietaria, vitaminas, minerales y compuestos bioactivos (Véliz *et al.*, 2023). Este contenido es variable depende de factores como la especie, tiempo de su recolección, estacionalidad, nivel de crecimiento, temperatura, limitación de nutrientes, pH y hábitat. Particularmente, se evidencia una mayor cantidad de proteínas en verano, cambios en la concentración de hidratos de carbono dependientes de la maduración del alga siendo esta mayor en temporadas cálidas, mayor nivel de lípidos en primavera, asociado directamente a la temperatura, y una concentración de compuestos bioactivos dependiente de factores de estrés como la radiación solar y altas concentraciones de oxígeno (Figuroa *et al.*, 2021).

1.2.1 Macronutrientes en las algas

Considerando lo antes expuesto, las proteínas se encuentran en cantidad elevada en algunas especies de algas, en particular en las *Rodhophytas*, las cuales pueden tener 10% y hasta un 47% de este macronutriente en 100 g de su peso seco. Ejemplo de ello, es la especie *Porphyra*, que es caracterizada en diferentes estudios con un contenido proteico de 25 a 47% de peso seco (Figuroa *et al.*, 2021; Peñalver *et al.*, 2020) . Las algas rojas contienen ficobiliproteínas solubles en agua específicas de su especie como la ficoeritrina y la ficocianina, que funcionan como pigmentos fotosintéticos accesorios, que además de ser utilizados en tecnología alimentaria como colorantes naturales, se consideran de importancia biomédica pues se le atribuyen propiedades funcionales como inmunomoduladoras, antiinflamatorias, neuroprotectoras, hepatoprotectoras y antioxidantes (Stadnichuk y Tropin, 2017; Díaz-Dominguez *et al.*, 2016) . Para algas presentes en la costa chilena, estudios han cuantificado la cantidad de ficobiliproteínas presentes en el alga fresca *Agarophyton chilense* (*ex Gracilaria chilensis*), cuya concentración de proteínas alcanza alrededor de 15% en 100 gramos de peso seco, y tiene concentraciones de ficoeritrina y ficocianina de 0,549 mg/g de proteína y 0,249 mg/g de proteína, respectivamente(Tello-Ireland *et al.*, 2011) . Las algas verdes, suelen tener una menor cantidad de proteínas que las rojas, y pueden poseer una concentración de proteínas de 10% a 30% de su peso seco, siendo una de las principales representantes de esta especie en Chile, la *Ulva lactuca*, que es caracterizada nutricionalmente en estudios con una cantidad de proteínas de 10 a 20% en 100 gramos de peso seco (Figuroa *et al.*, 2021; Véliz *et al.*, 2023; Peñalver *et al.*, 2020) . Sin embargo, algunas producciones con microalgas verdes como *Chlorella spp* puede contener hasta 60% de proteínas en 100 gramos peso seco, y la cual tiene una digestibilidad de 76%, con un perfil de aminoácidos y contenido de aminoácidos esenciales comparable con proteínas animales como el

huevo (Matos, 2019; Demarco *et al*, 2022; Wells *et al*, 2016) . Similarmente, la cianobacteria *Ahthrospira spp* conocida como espirulina, puede alcanzar hasta 70% de proteínas en 100 gramos peso seco, y su digestibilidad alcanza el 81%. Las algas pardas, en tanto, son las que menor concentración de proteínas tienen con un rango de 5 a 15% en 100 gramos de peso seco. Para, *Durvillaea antarctica* el rango de proteínas es de 10 a 12% . destacando, dentro de su contenido aminoacídico la presencia de histidina y valina, pero con isoleucina y leucina como aminoácidos limitantes en su tallo y lisina en las hojas. (Mateluna *et al*, 2020; Figueroa *et al*, 2022; Tiwari y Troy, 2015; Ortiz *et al*, 2006.) La biodisponibilidad de las proteínas de las algas puede verse reducida por la alta cantidad de compuestos fenólicos, o también por la presencia de uniones fuertes entre las fibras de la matriz extracelular, que impiden su salida (Dominguez, 2013; Pérez-Lloréns y Hernández- Carrero, 2016).

En relación con el contenido lipídico, las algas presentan una cantidad muy baja de este macronutriente, con concentraciones no superiores al 5%, siendo mayor la cantidad de lípidos a menores temperaturas Entre los lípidos destacan los ácidos grasos monoinsaturados y poliinsaturados (PUFAs), los que pueden alcanzar un 30 y 70% del contenido lipídico total (Ibáñez, 2017). En las algas se observa una mayor PUFAs, en comparación a vegetales terrestres, destacándose el contenido de ácido eicosapentaenoico (EPA) y el ácido docosahexaenoico (DHA) por parte de los ω -3, mientras que el ácido araquidónico (AA) sobresale del grupo de los ω -6.(Pérez-Lloréns y Hernández-Carrero, 2016). Además, se documenta que los PUFAs son entre un 30 y 70% del contenido lipídico total de las algas. La relación entre ω -6 y ω -3, suele ser baja en las algas, fluctuando entre 0,3 a 1,8. Esto resulta beneficioso para la salud ya que una razón entre 1 a 4 es óptima para la disminución del riesgo cardiovascular.(Simopoulos, 2018) . Al comparar el contenido de lípidos entre las algas de diferente coloración, se logra identificar que las algas rojas poseen un contenido mayor de EPA, ácido palmítico, oleico y AA y la concentración de lípidos totales en las mismas, puede llegar hasta un 2% en la especie *Porphyra*, y a 3% en la especie *Agarophyton Chilense (Gracilaria chilensis)*, la que contiene un 1,3% de EPA en sus lípidos totales, y una relación ω -6: ω -3 de 3,42 (Gutiérrez *et al*, 2016). En cuanto a las algas verdes, se identifica mayor cantidad de ácido linoleico, α -linolénico, palmítico, oleico y DHA, en especies como *Ulva lactuca* que puede alcanzar hasta el 4% de lípidos en 100 gramos de peso seco. Se debe mencionar, que dentro de este contenido lipídico el porcentaje de EPA corresponde a 1 % DHA en tanto, corresponde al 0,8% y la relación ω -6: ω -3 es de 1,31. En cuanto a las algas pardas, estas contienen elevados valores de ácido oleico, linoleico y α -linolénico, además de EPA y DHA. Un ejemplo de este tipo de algas es *Durvillaea antarctica*, que tiene una concentración total de lípidos de 0,1 a 4% en 100 gramos de peso seco, con un relación de ω -6 : ω -3 de 2. Al al mismo tiempo, su porcentaje de EPA es de 4,95% y de DHA es de 1,66% (Mateluna *et al*, 2020). Las microalgas aportan estos ácidos grasos esenciales a pescados y otros mariscos, y de igual manera, son una fuente utilizadas como suplementos para aceites ricos en ω -3. Por este motivo, estas pueden alcanzar hasta 40% según las condiciones de cultivo de las ellas, estos aceites y extractos suelen tener una biodisponibilidad que puede llegar al 100%. No obstante, en las macroalgas, su bioaccesibilidad es más reducida y puede alcanzar el 12 o 30%, lo que puede estar asociado a que la mayoría de sus lípidos se encuentran asociados a la membrana celular.(Wells *et al*, 2016; Demarco *et al*, 2022).

En cuanto al contenido de carbohidratos, estos corresponden esencialmente a polisacáridos, los cuales son componentes estructurales de la pared celular de las algas (Ibáñez, 2017). De igual modo, existen algunos polisacáridos exclusivos de las algas como los alginatos utilizados como espesantes en la industria alimentaria y que se concentran mayormente en algas pardas; los carragenanos que se forman por galactosa y anhidrogalactosa y tienen la capacidad de formar geles, y el agar que se forma por distintas unidades de galactosa (agarosa y agarpectina). Estos polisacáridos no digeribles forman la fibra dietética o dietaria (Pérez-Lloréns y Hernández-Carrero, 2016). Los carbohidratos pueden alcanzar entre el 20 y hasta 80% del peso seco de las algas, de los cuales entre un 36 a 60% corresponden a fibra dietética total, la cual en su mayoría no es digerible por las enzimas digestivas, de manera que las algas no constituyen una fuente de carbohidratos a nivel de biodisponibilidad. Ahora bien, la fibra dietética proporciona beneficios para la salud, asociados justamente a su baja digestibilidad. La fibra se divide en dos tipos: soluble e insoluble, la primera de ellas es caracterizada por su capacidad de aumentar la viscosidad, reducir la respuesta glicémica, mantener colesterol, y formación de la microbiota intestinal, entre otros; Mientras que, la segunda tiene la capacidad de absorber el agua favoreciendo el tránsito intestinal (Peñalver *et al*, 2020). La relación entre fibra soluble y fibra insoluble es mayor en algas que en vegetales terrestres, la fibra soluble puede alcanzar desde el 67 a 85% del total de la fibra en macroalgas pardas, y un 52 a 56% en macroalgas verdes y rojas, convirtiéndose en la fibra mayoritaria en este tipo de algas. En el caso de *Durvillaea antarctica*, se documenta una cantidad de 27,7 gramos de fibra soluble y 43,7 gramos de fibra insoluble en 100 g de alga.

1.2.2 Micronutrientes en las algas

Las algas marinas se destacan por su contenido de vitaminas y en particular, de minerales los cuales suelen encontrarse en cantidades apreciables. En algunas especies puede representar alrededor del 40% de su peso seco, lo que es superior a lo cuantificado en vegetales terrestres (5-10%) (Pérez-Lloréns y Hernández-Carrero, 2016). Lo que puede atribuirse a su capacidad de bioadsorción y bioacumulación que finalmente permite que sus niveles de minerales, sean entre 10 y a 100 veces mayores que en plantas terrestres, como en el caso de la espinaca, que es conocida por su gran cantidad de minerales, los que representan alrededor del 20% de su peso seco, lo que es menor a lo señalado anteriormente para algunas especies de macroalgas. Se ha asociado su biodisponibilidad a la presencia de macronutrientes como los carbohidratos y en particular, en aquellos con altas cantidades de fibra dietaria, hay una mayor biodisponibilidad de los metales. Esto se puede explicar por la formación de micelas que se atribuye a los carbohidratos y polisacáridos hidrofóbicos presentes en las algas y que permitirían el incremento de la absorción de los metales. En contraste, la presencia de proteínas puede tener una relación negativa con la biodisponibilidad de minerales, pues estas durante la digestión *in vitro*, se hidrolizan en aminoácidos los que poseen cargas eléctricas (positivas-negativas) lo que aumenta la presión iónica en la fase acuosa, ocasionando una menor solubilidad de los metales contenidos. Y lo mismo se puede evidenciar en los lípidos, pues los minerales no se emulsionan en presencia de ácidos biliares, lo que afecta su accesibilidad (Demarco *et al*, 2022).

Grosso modo, las algas contienen altas concentraciones de minerales como sodio (Na), magnesio (Mg), fósforo (P), potasio (K), yodo (I), hierro (Fe) y zinc (Zn), por ende, contribuyen a cubrir los requerimientos asociados a estos, y que incrementan su biodisponibilidad al encontrarse principalmente quelados y en forma coloidal.

(Pérez-Lloréns y Hernández-Carrero, 2016) Minerales como el Na, se encuentran de manera abundante en algas, dada la capacidad de estas de absorber los minerales del ambiente marino. El contenido de este varía entre los diferentes tipos de algas y habitualmente, son superiores en algas pardas, como en *Durvillaea antarctica*, en que se presenta en 0,5 gramos /100 g peso seco. Para la misma alga, se ha documentado una concentración de K de 0,16 g/ 100g peso seco, y se menciona que las algas pardas aportan hasta el 15% de la DDR (dosis diaria recomendada) de este micronutriente. Con esto, es relevante mencionar que, si algunas algas contienen altas cantidades de Na y K, la relación Na/K suele ser baja en todas ellas, lo cual representa una propiedad saludable pues contribuye a disminuir la incidencia de la hipertensión arterial y producir un balance en la relación elevada de Na/K presente en la dieta occidental actual que se asocia a enfermedades cardiovasculares, por lo que es relevante mencionar que *Durvillaea incurvata*, presenta un ratio de 2.3 (Cardoso *et al*, 2015) . Así también, se ha reportado que las algas son grandes fuentes naturales de yodo (I), elemento primordial para la función óptima de la glándula tiroides y la síntesis de hormonas tiroideas en humanos.

Así también, se ha reportado que las algas son grandes fuentes naturales de yodo (I), elemento primordial para la función óptima de la glándula tiroides y la síntesis de hormonas tiroideas en humanos. Las algas marrones tendría la mayor capacidad de retención de este micronutriente, y en este sentido, *Durvillaea antarctica* contiene 0,102 mg/kg de peso seco, lo cual es suficiente para contribuir a la dosis diaria recomendada de 150 ug/ día.(Milinovic *et al*, 2021; Lozano y Díaz, 2020) En cuanto a los niveles de Ca, estos son mayores en algas marrones, con una concentración de 0,19 g/100 g de peso seco de *Durvillaea*, mientras que su contenido de Mg es de 0,09 g/ 100 gramos de peso seco, lo que se traduce en que no implica un gran aporte al DDR de este elemento, ya que sus aportaciones son menores al 15%. En cuanto al Hierro (Fe), este alcanza el 0,018 g/100 g de peso seco, lo cual implica un aporte a la DDR mayor del 16% (Véliz *et al*, 2023; Astorga y Mansilla, 2013).

Además de los minerales, las algas marinas poseen una gran cantidad de vitaminas. Macro y microalgas representan fuentes de vitaminas hidrosolubles y liposolubles, tales como vitaminas del complejo B, dentro de las cuales destaca el contenido de tiamina (B1), riboflavina (B2), cobalamina (B12), ácido fólico y sus derivados (5-metiltetrahidrofolato, 5-formyltetrahidrofolato y tetrahidrofolato), además de vitamina C como ácido L-ascórbico, y vitaminas liposolubles como la E en forma de tocoferoles, y la A en forma de carotenoides (Ibáñez, 2017). En concordancia a lo expuesto, la vitamina C en algas pardas y verdes tiene una concentración que fluctúa entre los 500 mg/ kg peso seco y los 3000 mg/kg peso, mientras que las algas rojas tienen niveles de vitamina C entre los 100 y 800 mg/kg peso seco. En el caso de *Durvillaea antarctica*, presenta una concentración de $417,3 \pm 36,1$ mg/100 g peso seco, lo cual es superior a incluso algunos vegetales y frutas terrestres conocidas por ser fuentes ricas de ella como naranja, kiwi, fresas, espinacas, entre otros, los cuales no superan los 90 mg/ 100 g. (Uribe *et al*, 2019; Linus Pauling Institute, 2023) Con respecto a las vitaminas del complejo B, las B1 y B2 se encuentra mayoritariamente en algas rojas y pardas, y de manera específica, la B12,

se encuentra en microalgas como la *Spirulina*, donde 1 gramo de ella sería suficiente para cumplir con el DDR. No obstante, aún existe controversia con respecto a su biodisponibilidad. La vitamina E, está disponible en *Durvillaea antarctica* con 245,9 mg/kg peso seco y esta contiene α -tocoferol, en cantidades superiores a los 400 mg/ 100 g de lípidos, además de carotenoides (vitamina A) en una concentración superior a los 5 ug/g peso seco (Uribe *et al*, 2019).

1.2.3 Compuestos bioactivos presentes en las algas

Las algas poseen compuestos que cumplen distintas funciones biológicas, tanto dentro de la estructura algal, como al ser consumidas por los seres humanos. Los compuestos bioactivos de las algas, corresponden a pigmentos fotosintéticos como la clorofila, carotenoides que incluyen xantofilas y β - caroteno, ficobiliproteínas (ficocianina, aloficocianina y ficoeritrina, la más abundante), polifenoles característicos como los florotaninos, además de polisacáridos como los fucoidanos, ulvanos y carragenanos. Estos compuestos han reportado actividades principalmente antioxidantes, aunque también se les atribuye otras como las anticancerígenas, antiobesidad, antitumorales, antidiabéticas, antihipertensivas y antiinflamatorias. (Lomartire y Gonçalves, 2022) Desde esta perspectiva, se debe mencionar a la fucoxantina, es un carotenoide xantófilo no provitamínico específico de las algas, predominantemente en algas pardas, en las cuales puede alcanzar hasta el 70% del total de carotenoides presentes en ellas, y que han demostrado propiedades antioxidantes, antiinflamatorias, antidiabéticas, antiobesidad y neuroprotectora. La fucoxantina, ha sido estudiada y extraída de diversas algas pardas como *Undaria*, *Sargassum*, *Laminaria*, *Eisenia*, *Alaria*, *Ecklonia*, *Hijikia*, entre otras. A nivel nacional, se ha determinado que el contenido de fucoxantina en *Durvillaea incurvata*, es de $0,312 \pm 0,012$ mg/g de peso seco. Para *Durvillaea spp.*, se reporta un contenido de clorofila a de $489,4 \pm 13,4$ ug/g peso seco y clorofilas c_1 y c_2 de $26,35 \pm 1,94$ ug/g peso seco (Burgos-Díaz *et al*, 2022; Uribe *et al*, 2019).

En cuanto a los compuestos fenólicos presentes en las algas, los más conocidos son los florotaninos, que se encuentran primordialmente en las algas pardas. Estos compuestos, altamente hidrofílicos, se forman de la polimerización de unidades monoméricas de floroglucinol (1,3,5 trihidrobenzeno) (Okeke *et al*, 2021). El floroglucinol se sintetiza a partir de la vía del acetato malonato o policétido y puede condensarse en cadena o en red para formar florotaninos con un rango muy variado de tamaños moleculares, los cuales van desde los 120 kDa hasta los 650 kDa. A nivel celular, los florotaninos se localizan en vesículas del sistema endomembranoso denominadas fisodos, las cuales al ser exocitadas provocan que los florotaninos sean insolubilizados por unión al ácido algínico. El contenido florotaninos de las algas depende de la especie de alga y de factores ambientales como el clima, intensidad de la radiación UV, temperatura, pudiendo representar hasta el 30% de los polifenoles presentes en el peso seco de las algas pardas. Estructuralmente, y basado en los enlaces que existen entre grupos hidroxilo y el floroglucinol, se clasifican en 6 subtipos: fucoles, floretoles, fucofloretoles, fuhaloles, carmaloles y eckoles (figura 1). Los cuales presentan diversas actividades biológicas, en las que se destaca la capacidad de neutralización de radicales libres, además de ser moduladores de proteínas y quelación de metales dentro de las algas, constituyendo un mecanismo de protección para las mismas contra la herbivoría, la radiación UVB y las concentraciones tóxicas de metales pesados. Según Erpel *et al*, 2020

durante los últimos 15 años se ha documentado, que estos compuestos son benéficos para la salud humana debido a su capacidad de modular diversos procesos fisiológicos (Erpel *et al*, 2020). En particular, se ha reportado mecanismos de inhibición de enzimas digestivas como la α -glucosidasa, α -amilasa y la lipasa pancreática, proteínas reguladoras de la adipogénesis como CEBP/ α , PPAR γ , SREBP-1c, adiponectina, inhibición de la síntesis de ácidos grasos a través de FAS, FABP4, leptina y resistina, todo ello asociado a la acción antiadipogénica, antiobesogénica y antidiabética, mientras que sus actividades antioxidantes se asocian a la actividad de enzimas antioxidantes como la superóxido dismutasa, catalasa y glutatión peroxidasa(Khan *et al*, 2022). Sin embargo, la mayoría de los estudios *in vitro e in vivo*, se han realizado en animales, siendo aun escasas las pruebas realizadas en humanos. .

1.3 Efectos de extractos de algas marinas en enfermedades no transmisibles

Los florotaninos han demostrado actividades antidiabéticas mediante la inhibición de las enzimas α -amilasa y α -glucosidasa en ensayos *in vitro e in vivo* (Murugan *et al*, 2015). Estas enzimas participan en la digestión y absorción de alimentos ricos en almidón, la primera de ellas transformando el almidón en maltosa e isomaltosa y la segunda, hidrolizando estos compuestos en glucosa para su absorción intestinal (Kawamura-Konishi *et al*, 2012) (34). Esta propiedad fue estudiada en un ensayo clínico, en que se utilizó una suplementación con el extracto comercial InSea (basado en *Fucus vesiculosus* y *Ascophyllum nodosum*). En el ensayo, se reportó una reducción, no significativa, de 9% en la glicemia postprandial luego de la ingesta de 50 g de pan blanco en sujetos suplementados 500 mg de InSea(. Al mismo tiempo, se observó una reducción de los niveles de insulina en plasma de 12,1% y un aumento de la sensibilidad a la insulina en un 7,9% en el grupo suplementado con InSea, lo que sugiere que este extracto podría ser efectivo para mejorar la homeostasis de insulina(Roy *et al*, 2011).

Los florotaninos aislados de algas como *Ecklonia cava*, han sido estudiados demostrando actividades antioxidantes, antiinflamatorias, anticancerígenas, antidiabéticas, antihipertensivas, antiadipogénicas, radioprotectoras y antialérgicas (Singh y Sidana, 2013; Heo *et al*, 2009; Lee *et al*, 2010; Li *et al*, 2009; Kang *et al*, 2005; Lee *et al*, 2017; Moon *et al*, 2011; Wijesekara *et al*, 2010). Uno de los florotaninos aislados más estudiados es el dieckol, el cual podría mejorar el metabolismo de lípidos y glucosa según lo reportado en ensayos *in vitro e in vivo*.(Kang *et al*, 2013). Ajo esta perspectiva, un ensayo *in vitro* estudió las actividades inhibitorias de α -glucosidasa y α -amilasa en ratas con diabetes inducida por estreptozocina, las cuales fueron divididas en 3 grupos de experimentación, grupo control que recibió alimento sin ningún tipo de suplemento o fármaco, el segundo grupo tratado con 0,5 gramos de dieckol en 100 gramos de alimento (extracto de *E. cava*) y un tercer grupo tratado con 0,005 gramos de rosiglitazona en 100 gramos de alimento (droga insulino sensibilizante). Las ratas fueron tratadas por 6 semanas, y sus valores de glucosa sanguínea fueron de $18,09 \pm 3,8$ mmol/l para el grupo control, y $10,50 \pm 3,48$ mmol/l en el grupo suplementado con dieckol, esto demuestra que la suplementación con este florotanino contribuye a la reducción de los niveles de glicemia, en relación con los grupos control no tratados (Lee *et al*, 2012). De igual modo, se evidenció una disminución en hemoglobina glicosilada (HbA1c) a un 7,5 % en el grupo suplementado con dieckol en comparación a un 13 % del grupo control. presentaba alrededor de 13%, mientras que presentaba alrededor de 7,5 %. Así también, se pudo

evidenciar una reducción de la insulina circulante siendo en el grupo control $115,56 \pm 9,03$ umol/l y en el grupo con dieckol de $52,36 \pm 3,61$ umol/l, lo que indica que extracto mejoraría la sensibilidad a la insulina. Cabe destacar que los efectos antidiabéticos del dieckol fueron incluso mayores que los del fármaco rosiglitazona (Lee *et al*, 2012; Sharifuddin *et al*, 2015).

El dieckol, ha demostrado tener efectos inhibitorios sobre las enzimas α -amilasa y α -glucosidasa (Lee *et al*, 2009). Mediante ensayos de actividad enzimática se evidenció que el dieckol tiene la capacidad de disminuir la actividad enzimática, logrando una inhibición del 80,53% y 50,62 % respectivamente sobre α -glucosidasa y α -amilasa; a una concentración de 0,67 mM de dieckol. De igual modo, observaron la eficacia del dieckol frente al inhibidor sintético de estas enzimas, acarbosa, se pudo demostrar que en una concentración de 0,33 mM de dieckol, hay una mayor reducción de la actividad de α -glucosidasa que con una concentración de 0,77 mM de Acarbosa (Lee *et al*, 2010). Para el dieckol extraído de *Ecklonia cava* y *Ecklonia stolonifera* también se han documentado propiedades antihipertensivas., a través de la inhibición de la enzima convertidora de angiotensina I (ACE I).n este sentido, se pueden observar actividades inhibitorias sobre la en modelos *in vitro* por parte de florotaninos de algas marinas *Phaeophytas* como *Ecklonia cava* y *Ecklonia stolonifera*. Los extractos etanólicos de estas algas mostraron propiedades inhibitorias significativas de la ACE con un IC50 de 0,96 mg/dl. Esta inhibición supone un control en los niveles de presión arterial, dado que la ACE, juega un rol importante en la conversión de angiotensina I al vasoconstrictor angiotensina II (Wijesinghe *et al*, 2011). De igual modo, se ha evidenciado propiedades antiadipogénicas en los extractos de *Ecklonia cava*, a través de estudios *in vitro* e *in vivo*. (Ko *et al*, 2013; Kong *et al*, 2010) En adipocitos en cultivo, se observó la inhibición de la acumulación de lípidos de manera dosis dependiente, obteniéndose una reducción del 63% con una concentración de 100 μ M en comparación al grupo control (sin tratamiento con dieckol). En cuanto al ensayo *in vivo*, se pudo observar que los ratones sometidos a tratamiento con dieckol con una dosis de 60 mg/kg de peso/ día, tenían una reducción del 55% de colesterol LDL en relación con el grupo control (Choi *et al*, 2015).

Los estudios de los efectos de antiabéticos y antiadipogénicos de los florotaninos se han realizado principalmente a partir se algas pardas presentes en costas de países asiáticos, habiendo escasos estudio sobre sobre las algas de costas nacionales. No obstante, en el caso de la *Durvillaea antarctica*, Un estudio publicado el año 2020, analizó las propiedades antidiabéticas de los extractos de seis especies diferentes de algas del sur de Chile, entre las cuales destaco el cochayuyo como el de mayor contenido fenólico, mayor capacidad antioxidante y mayor actividad antidiabética. En la investigación, se obtuvo como resultado que el extracto de *Durvillaea antarctica* obtenido mediante acetona, inhibió casi por completo la actividad enzimática de y α -glucosidasa, de una manera dosis dependiente, a una concentración de 1000 μ g/peso seco, lo cual es superior a lo logrado acarbosa, que tiene actividad inhibitoria de alrededor del 40% en 1000 μ g/ml.. No obstante, en otro estudio se señala que los extractos de esta alga obtenidos a través de Metanol pueden inhibir la enzima hasta en un 100%. En cuanto al contenido fenólico de esta alga, es importante destacar que los florotaninos pueden alcanzar hasta un 15% de los polifenoles presentes en su peso seco, lo que explica sus actividades antidiabéticas derivadas de estos compuestos bioactivos.(Pacheco et al, 2020). Adicionalmente, se ha hecho un estudio en *Durvillaea antarctica*, en que se evidenció la capacidad de extractos de esta alga de inhibir las enzimas α -

Amilasa y α -Glucosidasa, favoreciendo el control glicémico, debido a que la actividad de estas enzimas se relaciona directamente con el aumento en los niveles de glicemia. Otros blancos sobre el cual actúan los florotininos para modular la glicemia son las enzimas gluconeogénicas glucosa 6 fosfatasa (G6Pasa), fosfoenolpiruvato carboxiquinasa (PEPCK) y la glucocinasa (GK). El dieckol y el octafloreto han mostrado revertir la sobreexpresión de G6Pasa y PEPCK; y la expresión reducida de GK en un modelo de ratas, reduciendo los niveles de glucosa sanguínea e incrementando los niveles de glucógeno. (Pacheco *et al*, 2020; Erpel *et al*, 2020)

Las algas marinas han demostrado a nivel de ensayos *in vitro* e *in vivo* propiedades antiadipogénicas, relacionadas a sus componentes bioactivos. En el ámbito de estudios *in vitro* se destaca uno realizado por Kong y cols., en el cual se evaluó el potencial de inhibición de diferenciación de adipocitos en células 3T3 L1 de extractos de alga parda *Ecklonia Cava*. Siendo el 1-(3',5'-dihydroxy phenoxy) -7-(2'',4'',6-trihydroxyphenoxy)-2,4,9-trihydroxydibenzo-1,4-dioxina el derivado de floroglucinol, el que disminuye los niveles de expresión de factores de transcripción de C/EBP α y PPAR γ , los que se expresan en adipocitos diferenciados terminales. Al mismo tiempo, se han detallado hallazgos similares para otros florotatinos, como dieckol, eckol, floroglucinol y florofucofuroeckol, donde se han demostrado disminuciones en la expresión de SREBP1 mediado por la activación de AMPK. (Kong *et al*, 2010) En cuanto a estudios *in vivo*, el efecto adipogénico en modelos de ratones alimentados con dieta alta en grasas, se observa una reducción del colesterol LDL en sangre, además de reducción de tejido adiposo a nivel visceral todo esto producido por acción del florotatinino dieckol. Estas evidencias permiten inferir, que compuestos bioactivos de algas pardas chilenas pueden tener potenciales efectos antiadipogénicos similares a otras especies provenientes de otras costas (Ko *et al*, 2013)

Tabla 1. Efectos de extractos de algas marinas en enfermedades no transmisibles

Ref.	Especie de alga	Tipo de ensayo	Tipo de extracto y tratamiento	Efecto metabólico
Roy et al, 2011	<i>Ascophyllum nodosum</i> <i>Fucus vesiculosus</i>	<i>In vitro</i> : ensayo enzimático α -glucosidasa sintética y α -amilasa salival humana <i>In vivo</i> : ratas wistar macho	Extracto comercial PTH 25 ug/ml de PTH	Efectos en α -glucosidasa y α -amilasa: -Inhibe un 90% aproximadamente α -glucosidasa (IC50= 5,0 ug/ml) -Inhibe totalmente α -amilasa (2,8 ug/ml) Efecto sobre glicemia -Reducción 90% del aumento de glicemia postprandial -Peak de insulina reducido en 40%
Kang et al, 2013	<i>Ecklonia cava</i>	<i>In vivo</i> : suplementación ratones C57BL/KsJ-db/db <i>In vitro</i> : análisis de actividad enzimática en tejido pancreático de ratones C57BL/KsJ-db/db	Metanólico (florotanino aislado: dieckol) 10 mg de extracto/ kg de peso 10 mg de extracto / kg de peso	Efectos sobre DM2: -Reducción significativa de glicemia - Reducción de niveles de insulinemia - Aumento de fosforilación AMPk y AKT. Efecto antioxidante -Aumento de actividad de superóxido dismutasa (SOD) -Reducción de peroxidación lipídica (TBARS)
Lee et al, 2012	<i>Ecklonia cava</i>	<i>In vivo</i> : suplementación ratones C57BL/KsJ-db/db <i>In vitro</i> : análisis tejido hepático de ratones C57BL/KsJ-db/db	Metanólico (florotanino aislado: dieckol) 0.5 g de extracto/ 100 g de alimento	Efecto en DM2 -Reducción de hemoglobina glicosilada -Reducción niveles de glicemia - Reducción de insulina plasmática y HOMA _{IR} Efectos sobre lípidos séricos -Reducción de colesterol total y triglicéridos -Aumento de colesterol HDL Efecto en tejido hepático -Aumenta actividad de glucocinasa y glucógeno hepático - Reduce glucosa 6 fosfatasa, ALT y AST
Lee et al, 2009	<i>Ecklonia cava</i>	<i>In vitro</i> : Ensayos de inhibición enzimática de α -glucosidasa intestinal de rata y α -amilasa pancreática porcina	Metanólico (florotánicos aislados) Fucodifloroethol G Dieckol 6-6' bieckol 7- floroieckol Florofucofuroeckol A Dieckol 7- floroieckol	Inhibe α -glucosidasa IC50= 19.52 umol L-1 IC50= 10.79 umol L-1 IC50= 22.22 umol L-1 IC50= 49.49 umol L-1 * IC50= 19.71 umol L-1 Inhibe la α -amilasa IC50= 125.98 umol L-1 IC50= 250.02 umol L-1

Lee et al, 2010	<i>Ecklonia cava</i>	<i>In vitro</i> : células endoteliales de cordón umbilical	Metanólico (florotanino aislado: dieckol) 50 ug/ml	Efecto sobre estrés oxidativo inducido por altos niveles de glucosa -Aumento viabilidad celular (79.7%) -Inhibición de formación de TBARS -Reducción de producción de ROS y NO. -Inhibición de expresión de iNOS y Cox-2 (vía de síntesis NO) -Inhibición de actividad NF-κβ
Wijesinghe et al, 2011	<i>Ecklonia cava</i>	<i>In vitro</i> : análisis de actividad enzimática de Enzima Convertidora de Angiotensina (ACE)	Etanólico 1 g de extracto/100 ml	Efecto sobre ACE -Inhibe la actividad de ACE (IC50=0.96 mg/dL) - Inhibidor no competitivo de ACE
		<i>In vitro</i> : Línea celular EAhy926 (revestimiento interno de vasos sanguíneos humanos)	Dieckol 0.54 mM	Aumento de la producción de NO en 100% en concentraciones mayores a 0.27 mM.
Ko et al, 2013	<i>Ecklonia cava</i>	<i>In vitro</i> : línea celular 3T3-L1 de ratón en proceso de diferenciación a adipocitos	Metanólico 100 ug de extracto/ml Dieckol 100 uM	Efecto en adipogénesis -Inhibe acumulación de lípidos (70%) -Inhibe expresión de PPARγ, C/EBPα, SREBP-1, FABP4 (promotoras de la adipogénesis)
Choi et al, 2015	<i>Ecklonia cava</i>	<i>In vitro</i> : línea celular 3T3-L1 de ratón en proceso de diferenciación a adipocitos	Metanólico Dieckol 100 uM	Efecto en adipogénesis -Reduce 65% la acumulación de lípidos -Reduce expresión de enzimas de la vía de síntesis de triglicéridos (LPAAT, LIPINA1, DGAT1) -Reduce expresión de factores de transcripción de adipogénesis temprana C/EBPβ, C/EBPδ y KLF4 -Aumenta expresión de factores que inhiben adipogénesis KLF1 y Pref-1 - Activa vía AMPKα
Pacheco et al, 2020	<i>Durvillaea antarctica</i>	<i>In vitro</i> : inhibición de actividad enzimática de α- glucosidasa de levadura y α-amilasa pancreática porcina	Etanólico 1000 ug/ ml de extracto Acetona 1000 ug/ml de extracto 2000 ug/ml de extracto	Efectos en de α- glucosidasa y α-amilasa: -Reduce la actividad de α- glucosidasa a 3.1 ± 0.4% - Reduce la actividad de α- glucosidasa a 0.7 ± 0.3% - Reduce actividad de α- amilasa en 56.6 ± 2 %

2. Hipótesis

Durvillaea antarctica presenta compuestos bioactivos extraíbles en solución acuosa que poseen propiedades antiadipogénicas, antidiabéticas y antioxidantes.

3. Objetivos

3.1 Objetivo general

Estudiar las propiedades antiadipogénicas, antidiabéticas y antioxidantes de compuestos bioactivos extraíbles de *Durvillaea antarctica* en individuos humanos y en modelos celulares y animales.

3.2 Objetivos específicos

3.2.1 Evaluar el efecto de un extracto acuoso de *Durvillaea antarctica* sobre la proliferación, viabilidad celular y estrés oxidativo inducido por peróxido de hidrógeno, en un modelo celular de preadipocitos de ratón.

3.2.2 Evaluar el efecto de un extracto acuoso de *Durvillaea antarctica* sobre el metabolismo glucídico, lipídico y la peroxidación lipídica en ratones BALB/c macho adultos sometidos a una dieta alta en grasa.

3.2.3 Evaluar el efecto de una infusión de *Durvillaea antarctica* sobre la respuesta glicémica postprandial a carbohidratos complejos en personas adultas.

4. Materiales y Métodos

4.1 Ensayos en modelo de preadipocitos

4.1.1 Cultivo de células 3T3-L1

Los ensayos in vitro se ejecutaron en la línea celular 3T3-L1 de preadipocitos de ratón, las que fueron cultivadas a 37°C, en atmósfera de 5% de dióxido de carbono y humidificada, en medio Eagle modificado por Dulbecco (DMEM), suplementado con 5% de suero de ternero, 2 mM de glutamina y 100 U/mL de penicilina-estreptomicina (DMEMc -completo-). Las células fueron mantenidas en placas de 10 cm y traspasadas a placas de 24 pocillos para realizar ensayos de viabilidad, proliferación celular o estrés oxidativo; en los cuales cada condición experimental se realizó en triplicado.

4.1.2 Ensayos de viabilidad celular

Para los ensayos de viabilidad celular se sembraron 10^5 células por pocillo en medio completo, se realizó lavado con buffer fosfato salino (PBS) y las células se incubaron por 24 hrs en DMEM sin suero. Posteriormente, las células fueron tratadas con 10, 20 y 40 mg/mL de extracto de *D. antarctica* disuelto en medio de DMEMc y control sin extracto, por 24 hrs. Finalmente, la viabilidad celular se determinó por el ensayo de exclusión de azul de tripán. Para ello, se lavó cada pocillo con PBS y luego se incubó con 0,05% de tripsina y 0,02 % de EDTA para disgregar las células por 3 minutos. La digestión con tripsina se detuvo agregando DMEMc, junto con azul de tripán a una concentración final de 0,2 %. La suspensión celular fue agitada manualmente y se realizó recuento en cámara de Neubauer bajo microscopio óptico. Los resultados fueron presentados como promedio del número de células por pocillo para cada condición.

4.1.3 Ensayos de proliferación celular

Para los ensayos de proliferación celular se procedió de manera similar a lo descrito para viabilidad celular, sin embargo, la cantidad de células inicialmente sembrada fue de 20.000 células por pocillo (placa de 24 pocillos). De esta manera, el ensayo se inició con células pre-confluentes, las que se mantuvieron en proliferación en medio DMEMc en presencia de extracto de *D. antarctica* en un rango de 0,2 a 20 mg/mL, durante 48 horas. Posteriormente, se realizó el conteo de células según el protocolo de viabilidad celular anteriormente descrito.

4.1.4 Inducción de estrés oxidativo con peróxido de hidrógeno (H₂O₂)

Se sembraron 10^5 preadipocitos 3T3 por pocillo en DMEMc. Luego de lavar con PBS, las células fueron tratadas con H₂O₂ disuelto en PBS, en un rango de 0,001 a 1 mM, durante 30 minutos. Posteriormente, se descartó la solución de H₂O₂, se lavó con PBS y se mantuvieron las células en DMEMc por 6 horas a 37°C. Finalmente se determinó la viabilidad por exclusión de azul de tripán según se describió anteriormente.

4.1.5 Protección del extracto frente a estrés oxidativo inducido por H₂O₂

Se realizó inducción de estrés oxidativo según protocolo anterior exponiendo a las preadipocitos 3T3 a 0,1 mM de H₂O₂, en conjunto con extracto de *D. antarctica* en un rango de 0,06 mg/mL a 20 mg/mL; ambos disueltos en PBS. Luego de retirar el PBS de tratamiento, se agregó DMEMc suplementado con extracto manteniendo la concentración usada en la primera exposición simultánea a H₂O₂, e incubando por 6 horas. Finalmente se determinó la viabilidad por exclusión de azul de tripán según protocolo anterior, o alternativamente se determinó la fluorescencia asociada a tres marcadores de citotoxicidad: alamarBlue, CFDA-AM (5-carboxifluoresceína diacetato, acetoximetil ester) y rojo neutro; los cuales se asocian respectivamente a actividad metabólica, integridad de la membrana plasmática e integridad de la membrana lisosomal. Para ello, se retiró DMEMc suplementado con extracto, se realizó lavado con PBS y se incubó cada pocillo con 400 uL de solución de alamarBlue/CFDA-AM por 30 minutos a temperatura ambiente en oscuridad. La emisión de fluorescencia a 590 nm se detectó en un lector de microplacas Synergy H1 Biotek (Agilent). Posteriormente se descartó la solución de alamarBlue/CFDA-AM y se agregó 400 uL de rojo neutro por pocillo, incubando 60 minutos a temperatura ambiente en oscuridad. Luego de descartar la solución de rojo neutro, se realizó fijación de las células con 400 uL de formaldehído al 4% y posterior extracción en solución de acetato al 2% en etanol durante 10 minutos con agitación de la placa en la oscuridad. Se determinó la emisión de fluorescencia a 645 nm, correspondiente a rojo neutro, en un lector de microplacas Synergy H1 Biotek (Agilent).

4.2 Exposición de ratones a extracto de *D. antarctica*

4.2.1 Mantenimiento de animales

Se adquirieron 20 ratones BALB/c macho de 12 semanas de edad, en el Instituto de Salud Pública (IST), Santiago de Chile y fueron recibidos en marzo del 2022. Antes de someterlos a las condiciones experimentales, fueron aclimatados en el bioterio de la Facultad de Medicina de la Universidad Católica de la Santísima Concepción, por un periodo de un mes en condiciones ambientales controladas tales como: temperatura de 23° a 25° C, ciclo de luz y oscuridad 12hrs/12hrs. Durante el aclimatamiento fueron alimentados con 5 gramos por día de pellet de dieta normal (Laboratory rodent diet 5001*, Lab diet) *ad libitum* y agua. El mantenimiento y estudio de animales se realizó siguiendo las buenas prácticas establecidas en los documentos de ANID: (i) Manual de Normas de Bioseguridad y Riesgos Asociados y (ii) Lineamientos Bioéticos para la Investigación en Animales (ANID), que incluyen el principio de las 3R (reemplazar, reducir y refinar).

4.2.2 Protocolo de tratamientos

Los 20 ratones fueron distribuidos en 5 jaulas, conteniendo 4 animales cada una. Sin embargo, durante el procedimiento experimental, algunos animales presentaron comportamiento agresivo causando la muerte de 3

compañeros de jaula. Por ello, algunos ratones se reubicaron en jaulas con menor número de animales. Los 17 animales disponibles fueron distribuidos en 4 grupos experimentales: el primero con 5 animales, alimentados con dieta normal (Laboratory rodent diet 5001*, Lab diet) cuya composición nutricional es 2,86 kcal/g; 28,9% de proteínas; 13,6% de lípidos y 57,4% de carbohidratos. El segundo grupo, fue alimentado también con dieta normal y conjuntamente, se les administró 66,6 mg/kg de peso del animal de extracto de *D. antarctica* vía sonda orogástrica, dos veces por semana, en un periodo total de 10 semanas. Los grupos 3 y 4, fueron alimentados con una dieta alta en grasa (DIO D12451, Research diets inc.) que nutricionalmente estaba compuesta de 4,73 kcal/g, 20% de proteínas, 35% de carbohidratos y 45% de grasas. Al igual que el grupo 2, el grupo 4 recibió el tratamiento vía sonda orogástrica de extracto de *D. antarctica* 2 veces por semana durante 10 semanas en total. Durante todo el desarrollo experimental los animales tuvieron acceso *ad libitum* a sus respectivas dietas, llevando a cabo un control del consumo del alimento por pesaje tres veces por semana.

4.2.3 Determinaciones en los animales

Los animales fueron sometidos a medición de peso corporal 2 veces por semana, durante toda la extensión de la experimentación, en una balanza digital (CORE CQT251, Adam Equipment). Se realizaron controles periódicos de glicemia mediante glucómetro (URight) mediante sangre capilar obtenida por corte en la punta de la cola. También se realizó un ensayo de tolerancia a glucosa una sola vez antes de finalizar las 10 semanas tratamiento, mediante la inyección intraperitoneal de 30 mg de glucosa en 100 uL de suero fisiológico estéril (1 mg de glucosa por g de peso). Posteriormente se determinó la glicemia a los 0, 30, 60, 90 y 120 segundos postcarga de glucosa con glucómetro, obteniendo el área bajo la curva de glicemia en el tiempo. Al finalizar el tratamiento de 10 semanas se llevó a cabo el sacrificio de los ratones mediante inyección letal de pentobarbital al 3% en agua destilada. Seguidamente, se realizó disección del animal, extrayendo toda la sangre disponible por la vena cava inferior a través de jeringa (estando este aun con vida, para evitar coagulación), obteniendo un rango de 100 y 200 uL de sangre por ratón. Estas muestras fueron centrifugadas por 5 minutos a 1000 rpm, separando el suero, el que fue almacenado a -80° C. De igual modo, mediante punción de la vejiga se extrajeron muestras orina, cuando estuvieran disponibles (n=15), y las cantidades extraídas estuvieron en el rango de 80 a 200 uL, las cuales fueron almacenadas en congelador a -80°C. Adicionalmente, se extrajeron muestras de tejido adiposo epididimal, tejido hepático y tejido muscular (músculo gastronómico), de la cuales se extrajeron porciones de 100 mg para ser almacenadas en contenedores con 4 ml de formalina para estudios histológicos, en 500 uL de solución comercial RNA later para preservación de ARN para estudios de expresión y en 500 uL de buffer RIPA para análisis de western blot. En el caso del tejido adiposo epididimal se extrajo la totalidad del tejido para determinar su peso y su apariencia con registro fotográfico. Los restos de los animales se eliminaron como desechos de material biológico, de acuerdo con el protocolo “Lineamientos bioéticos para la investigación en animales” de ANID, a través del servicio de eliminación la empresa de residuos VEOLIA.

4.3 Determinaciones de metabolitos por métodos espectrofotométricos

4.3.1 Colesterol total en suero

La determinación de colesterol total en suero se realizó mediante el método enzimático de punto final CHOD-PAD, el cual se basa en el acoplamiento de las reacciones de la colesterol oxidasa y peroxidasa, a través de peróxido de hidrógeno como intermediario común. Para la reacción se utilizó el kit comercial Colesterol Liquiform (Labtest), se descongelaron las muestras a temperatura ambiente y mezclaron 5 uL de cada muestra de suero con 500 uL de reactivo enzimático y se incubaron a 37°C por 5 minutos. Como controles, se realizó la reacción para estándar de colesterol de 200 mg/dL y agua destilada (blanco reactivo). La medición de absorbancia se realizó en fotómetro (Photometer 5010 v5+m Robert Riele) a una longitud de onda de 492 nm, midiendo consecutivamente el blanco, estándar y posteriormente las muestras.

4.3.2 Triglicéridos en suero

La determinación de triglicéridos en suero se realizó mediante método enzimático de punto final, basado en la una secuencia de reacciones de lipoproteína lipasa, glicerolquinasa, glicerol-3-fosfato oxidasa y peroxidasa; produciendo el quinoneimina como producto final coloreado a partir de triglicéridos. Para la reacción se utilizó el kit comercial Triglicéridos Liquiform (Labtest). Para ello se descongelaron las muestras a temperatura ambiente, y mezclaron 5 uL de cada muestra de suero con 500 uL de reactivo enzimático y se incubaron a 37°C por 5 minutos. Como controles, se realizó la reacción para estándar de triglicéridos de 200 mg/dL y agua destilada (blanco reactivo). La medición de absorbancia en fotómetro (Photometer 5010 v5+, Robert Riele) se realizó a longitud de onda de 492 nm, midiendo el blanco, estándar y muestras, consecutivamente.

4.3.3 Colesterol LDL en suero

La determinación de colesterol LDL en suero se realizó mediante una modificación del método enzimático de punto final CHOD-PAD, el cual permite excluir a quilomicrones, cVLDL y cLDL previo al paso de oxidación de colesterol. Se cuantificaron los niveles de colesterol LDL mediante el kit comercial LDL Cholesterol liquicolor (Human Diagnostics). Para este fin, se descongelaron las muestras de suero a temperatura ambiente, y se mezclaron con 5 uL de estándar calibrador (239 mg/dL en cLDL) y 750 uL de reactivo enzimático (R1), incubando a 37°C durante 5 minutos. Posteriormente se agregó 250 uL de sustrato (R2), incubando a 37° por 5 minutos para finalmente medir absorbancia a 555 nm en fotómetro (Photometer 5010 v5+, Robert Riele).

4.3.4 Glucosa en orina

La determinación de los niveles de glucosa en orina de los animales se realizó mediante método enzimático de punto final GOD-PAP, el cual se basa en el acoplamiento de las reacciones de la glucosa oxidasa y peroxidasa, a través de peróxido de hidrógeno como intermediario común. Para realizar el ensayo colorimétrico se usó el kit comercial Glucose Liquicolor (Human Diagnostics), mezclando 10 uL de muestra con 1 mL de reactivo e incubando por 5 minutos. Reacciones análogas se realizaron con agua para blanco reactivo y con estándar de

glucosa. La medición de absorbancia a 492 nm se realizó en fotómetro (Photometer 5010 v5+, Robert Riele).

4.3.5 Proteínas totales en orina

La determinación de proteínas totales en orina se realizó mediante reacción de Biuret, en la cual los enlaces peptídicos reaccionan con iones Cu^{2+} en medio alcalino formando un complejo de color violeta. Para realizar la reacción se utilizó el kit comercial de proteínas totales (Labtest), mezclando 10 uL de cada muestra con 1 mL de reactivo de proteínas totales y posterior incubación a 37°C por 5 minutos. Simultáneamente se realizó la reacción agua destilada (blanco) y para estándar de albúmina de suero bovino de 4 g/dL. Se realizó la medición de absorbancia a 546 nm en fotómetro (Photometer 5010 v5+, Robert Riele).

4.3.6 Creatinina en orina

La determinación de creatinina en orina se realizó mediante el método de Jaffe, el cual se basa en la cinética de reacción no enzimática de creatinina con ácido pícrico. Para realizar la reacción se utilizó el kit comercial Creatinine Liquicolor (Human Diagnostics). Para ello se descongelaron las muestras a temperatura ambiente, y se diluyeron con factor de dilución 50 en PBS 1X, y se agitaron en vórtex. El reactivo fue reconstituido mezclando reactivo A (ácido pícrico) con reactivo B (NaOH) en partes iguales, para luego agregar 1 mL de reactivo reconstituido a 100 uL de muestra. Reacciones análogas fueron realizadas para agua y estándar de creatinina (2 mg/dL). Las mediciones de absorbancia a 492 nm se realizaron a 37° inmediatamente luego de realizar la reacción y a los 2 minutos en fotómetro (Photometer 5010 v5+, Robert Riele)

4.3.7 Urea en orina

Se determinaron los niveles de urea urinario con el Kit Urea UV cinética AA, Wiener Lab. Para ello se descongelaron las muestras a temperatura ambiente, y se diluyeron con factor de dilución 50, con 10 uL de muestras a más 490 uL de PBS 1X, y se agitó en vortex. El kit contiene 2 reactivos, con los que se realiza una solución que contiene 16 mL de reactivo A y 4 mL de reactivo B, creando un stock para 20 muestras. Se consideran tubos para muestras (n=15), blanco y dos estándar (Urea 0,6 g/L), a estos tubos se añaden 1000 uL de reactivo más 100 uL de agua, estándar y muestras en tubos diferentes, respectivamente. El reactivo debe estar en estufa a 37°C y se retiran de la estufa en la medida que se efectuó la medición de absorbancia a 340 nm, agregando en este momento la muestra, blanco o estándar, según sea el caso y se realiza la medición de inmediato en fotómetro (Photometer 5010 v5+, Robert Riele).

4.3.8 Transaminasa hepática GOT en suero

Se realizó la determinación de GOT, mediante el kit AST/GOT liquiform (Labtest), el cual se basa en la medición de la velocidad de reacción catalizada por la GOT presente en la muestra, a través del NAD + producido por acoplamiento con la reacción de la enzima malato deshidrogenasa. Para ello se preincuba 100 uL de muestra o calibrador con 800 uL de reactivo 1 (L-aspartato 330 mM, pirodoxal fosfato 11,1 mM) a 37°C por

5 minutos. Luego se agrega 200 uL de reactivo 2 (a-cetoglutarato 66 mM) y se determina absorbancia a 340 nm inmediatamente luego de iniciar la reacción (A1) y a los 60 segundos de transcurrida la reacción (A2).

4.3.9 Determinación de TBARS (sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico)

Este ensayo produce una reacción colorimétrica de peróxidos lipídicos, esta reacción se produce entre el ácido tiobarbitúrico y el malonaldehído (MDA). Se realizó una curva de calibración con MDA comercial (Sigma Aldrich), además de dodecil sulfato de Sodio (Merck) 0,1 al %, ácido acético 20% (Sigma Aldrich) pH 3,5, ácido tiobarbitúrico (Sigma Aldrich) 0,8% y butanol:piridina 15:1 (Sigma Aldrich). Cada solución contenía un homogenizado de agua para blanco, MDA para curva de calibración o muestra de suero (n=13) 50 uL, SDS 400 uL, ácido acético 50 µl y TBA 400 uL. Estas muestras se mezclaron en vortex y posteriormente se calentaron a baño maría por 60 minutos a 100 °C. Posteriormente, se enfriaron bajo chorro de agua fría corriente, y se agregó 400 uL de butanol:piridina 15:1 y 250 uL de agua destilada, se agitaron nuevamente en vortex, y se centrifugaron a 1000 rpm por 3 minutos. Luego, se extrajo la fase orgánica y se midió en espectrofotómetro (Spectronic Genesys 5) a 532 nm. Con los valores obtenidos se calculó la concentración con la ecuación de recta obtenida de la curva de calibración y la absorbancia promedio por condición experimental.

4.4 Estudio randomizado cruzado para efecto agudo del cohayuyo

4.4.1. Participantes del estudio

Se reclutaron individuos adultos sin diagnóstico de hipertiroidismo ni enfermedad renal, incluyendo a personas sanas o personas con diagnóstico de enfermedades metabólicas en control médico, en cualquier estado nutricional (normal, sobrepeso u obeso) en el contexto del estudio “Efecto agudo y crónico del consumo de infusión de cohayuyo sobre el estado nutricional y metabolismo glucídico” del Proyecto Núcleo Científico Tecnológico para el desarrollo costero sustentable. Cabe destacar que el estudio completo se realizó entre enero de 2022 y julio de 2023, e involucró una intervención crónica de 1 mes con infusión de cohayuyo, sin embargo, la presente tesis solo comprende el efecto agudo con ingestión de la infusión en una sola oportunidad. Previo al inicio del estudio, los participantes firmaron un consentimiento informado (se adjunta formulario de consentimiento). El estudio fue aprobado por el Comité de Ético Científico de la Universidad Católica de la Santísima Concepción.

4.4.2 Preparación de la infusión de cohayuyo.

Se recolectaron ejemplares de D. antártica desde caleta Chome, comuna de Hualpén, las cuales fueron lavadas con agua de mar filtrada y cortadas en trozos de 1 cm² (aproximadamente), descartando el grampón. Los trozos fueron secados en deshidratadora a 40°C por 12 horas y posteriormente pulverizadas en molino para obtener un tamaño de partícula de 0,5 mm. Dos gramos del pulverizado de cohayuyo fueron dosificados en bolsas de té

de 4 x 5 cm y almacenados a temperatura ambiente. La preparación de la infusión se realizó antes su consumo, agregando 100 mL de agua hirviendo a la bolsa de té e incubándola a temperatura ambiente por 12 hrs. Antes de tomar la infusión, se apretó la bolsa de cochayuyo para permitir la salida de mayor cantidad de líquido en contacto con el cochayuyo.

4.4.3 Determinación de la respuesta glicémica a carbohidratos complejos.

En el primer día del estudio, los participantes realizaron un ayuno de 12 horas y determinaron la glicemia basal con glucómetro Uright en sangre capilar luego de puncionar un dedo. Posteriormente, bebieron 100 mL de agua de la llave a temperatura ambiente e inmediatamente después, consumieron 100 g de pan blanco (45 g de carbohidratos complejos disponibles) calentado en tostadora. A contar del consumo del pan en su totalidad, se comenzó a medir el tiempo, realizando mediciones de glicemia con glucómetro a los 15, 30 y 45 minutos post-consumo de pan. En el segundo día de estudio, los participantes realizaron un procedimiento análogo al día anterior pero reemplazando el consumo de agua por 100 mL de infusión de cochayuyo.

4.5 Análisis estadístico

Los resultados se presentan como la media \pm desviación estándar (DE) de los datos obtenidos. Los análisis estadísticos se realizaron con Microsoft Excel perteneciente al paquete Microsoft Office 365. Para el análisis de significancia se usaron los test ANOVA unidireccional para comparación de medias de tres o más grupos; o t de Student para comparar la diferencias entre medias en dos condiciones experimentales. Se consideró una diferencia estadísticamente significativa cuando el valor de p de la prueba estadística era menor que 0,05.

5. Resultados

5.1 Efecto de extracto de *Durvillaea antarctica* en modelo de pre-adipocitos.

5.1.1 Obtención de extracto acuoso de *Durvillaea antarctica*

El extracto de *Durvillaea antarctica* fue sintetizado por el Laboratorio de la Dra. Carolina Aguirre en el contexto del Programa de Recursos Naturales del Núcleo Científico Tecnológico para el Desarrollo Costero Sustentable. El extracto se obtuvo a través de un método de extracción (figura 1) que involucra la utilización de una muestra fresca de *Durvillaea antarctica*, su posterior congelamiento en nitrógeno líquido, la fragmentación de ella con un mortero, y posteriormente, su tratamiento extractivo a través de ultrasonido en agua (extracto acuoso -EAq) o con etanol al 50% (extracto alcohólico -EAI25-). Tras la obtención del extracto, se realizó un análisis de la composición de cada extracto (tabla 2) donde se detalla el contenido proteico, glucídico y de algunos compuestos bioactivos como fenoles, flavonoides y tioles. Para fines de la presente investigación, se decide utilizar EAq por presentar un solvente con menor potencial de interferir con las variables a investigar tanto en líneas celulares como en animales.

Tabla 2. Caracterización de extractos de *Durvillaea antarctica*

Tipo de extracto	Rendimiento (% p/p)	Fenoles (mg/g Ac. gálico)	Carbohidratos (mg/g glucosa)	Proteínas (mg/g albúmina)	Flavonoides (mg/g catequina)	Tioles (mg/g glutatión)
EAq	13	9,8±0,4	68,1±0,5	45,5±0,3	1,43±0,10	2,45±0,31
EAI25	20,1	17,3± 0,6	78,7±2,7	73,5±1,6	2,65±0,13	5,78±0,51

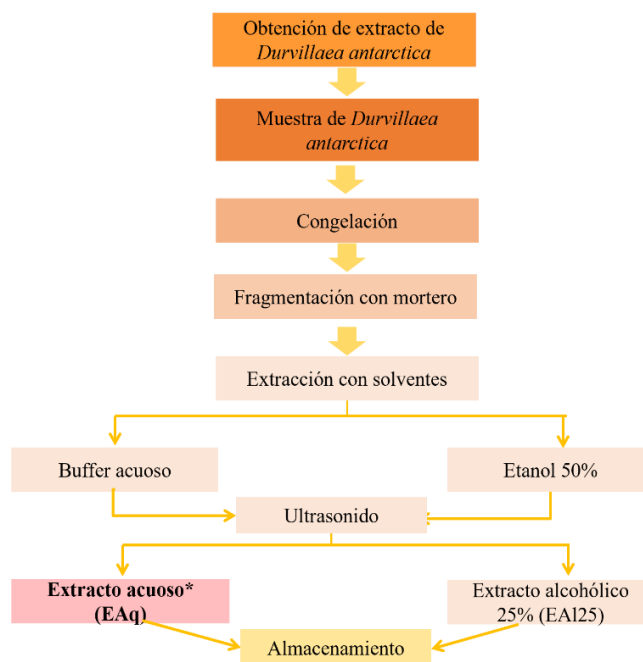


Figura 1. Procedimiento de obtención de extracto acuoso de *Durvillaea antarctica*

5.1.2 Efecto de extracto sobre viabilidad y proliferación de preadipocitos.

Inicialmente, se evaluó un potencial efecto tóxico del extracto de *D. antarctica*, mediante un ensayo *in vitro* en la línea celular 3T3-L1 de preadipocitos de ratón. Para ello, las células 3T3-L1 en 90% de confluencia, fueron incubadas por 24 horas en concentraciones crecientes del extracto acuoso (EAq) adicionado al medio de cultivo, para luego determinar viabilidad celular por el método de exclusión de azul de tripán. Este método, permite visualizar de color azul a las células con daño en la permeabilidad en la membrana plasmática, quedando sin coloración las células viables. En la figura 2A, se observa que la condición control sin extracto presentó una cantidad total de $1,8 \times 10^5$ células (100% de viabilidad). En los tratamientos con EAq no se observó mortalidad celular con ninguna de las concentraciones usadas, por el contrario, se encontraron aumentos en el número de células totales cercanos al 5%. Por otro lado, se evaluó el efecto de EAq sobre la proliferación de los preadipocitos 3T3-L1, los cuales fueron sembrados a una densidad de 5×10^4 células por pocillo de placa de 24 pocillos, obteniendo una confluencia inicial de cercana al 30% que resulta adecuada para proporcionar una superficie libre para la proliferación celular. En estas condiciones, las células fueron incubadas durante 48 h en medio completo en presencia de concentraciones crecientes de EAq, para finalmente determinar la cantidad de células presentes al finalizar el tratamiento. En la condición control sin extracto, se alcanzaron $2,1 \times 10^5$ células por pocillo, mientras que en los grupos tratados con EAq se observó una menor cantidad de células en forma dosis dependiente. Con la mayor concentración de EAq de 20 mg/dL se obtuvieron 6×10^4 células/pocillo, lo que representa una disminución de 60% en la tasa de proliferación respecto al control. Estos datos indican que si bien el EAq no induce muerte celular de los preadipocitos 3T3-L1 al ser evaluada por el método de exclusión de azul de tripán, pero sí provoca una reducción en la tasa de proliferación que es dependiente de la cantidad de EAq presente en el cultivo.

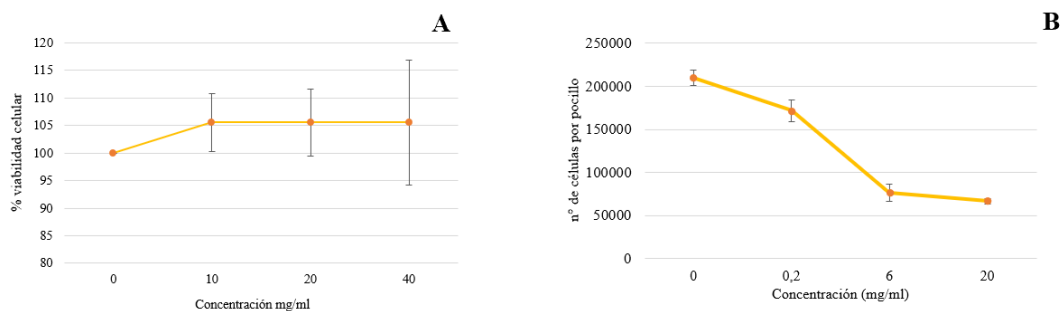


Figura 2. Respuesta celular de línea 3T3-L1 frente a extracto de *Durvillaea antarctica* (EAq) (A) Viabilidad celular en presencia de EAq; (B) Proliferación celular en presencia de EAq

5.1.3 Potencial protector del extracto frente a estrés oxidativo inducido por peróxido de hidrógeno.

Para evaluar el potencial antioxidante del extracto de *D. antarctica*, se estudió la capacidad del EAQ para proteger a las células 3T3-L1 frente al estrés oxidativo inducido por peróxido de hidrógeno (H_2O_2). Primeramente, se determinó la sensibilidad de la línea celular al H_2O_2 , para lo cual se expusieron las células a un rango de concentraciones de 0,001 a 1 mM de H_2O_2 durante 1 hora en buffer PBS. Posteriormente, se descartó el H_2O_2 , se reemplazó por medio de cultivo y al cabo de 6 horas luego del tratamiento prooxidante, se determinó la viabilidad celular por exclusión de azul de tripán. De acuerdo con el gráfico 3A, el H_2O_2 indujo una reducción de la viabilidad dosis dependiente, alcanzando una viabilidad cercana a 0 a una concentración 1 mM de H_2O_2 . Una reducción intermedia en la viabilidad se obtuvo al incubar con 0,1 mM de H_2O_2 , alcanzando una viabilidad del 30% respecto al control sin peróxido (0 mM). Se seleccionó la concentración 0,1 mM de H_2O_2 para inducir un estrés oxidativo que redujese parcialmente la viabilidad celular, de manera de evaluar si el EAQ pudiese proteger a las células de la muerte inducida en estas condiciones. Para el ensayo de protección, se incubaron las células por 1 hora simultáneamente con H_2O_2 1 mM y EAQ en un rango de concentraciones de 0,06 a 20 mg/mL disueltos en PBS. Posteriormente, se reemplazó el H_2O_2 disuelto en PBS por medio de cultivo con EAQ y se determinó la viabilidad a las 6 horas post tratamiento pro-oxidante. En la figura 3B, se observa una reducción del 80% en la viabilidad en la condición sin EAQ respecto al control, la cual es concordante con lo determinado en el ensayo previo de sensibilidad a H_2O_2 . Al co-incubar con el H_2O_2 con el EAQ, se observa que este logra rescatar las células de la muerte celular inducida por peróxido, elevando la viabilidad desde 20% en ausencia de EAQ hasta 54% en la máxima concentración de EAQ usada, igual a 20 mg/mL. La mayor reversión de la muerte celular se obtuvo en el rango de 0,06 a 0,2 mg/mL de EAQ, mientras que, a concentraciones mayores, el efecto protector no incrementa significativamente. Por lo tanto, estos resultados muestran que el extracto de *D. antarctica* presenta un efecto protector frente al estrés oxidativo inducido por H_2O_2 , permitiendo revertir parcialmente la muerte celular de células 3T3-L1.

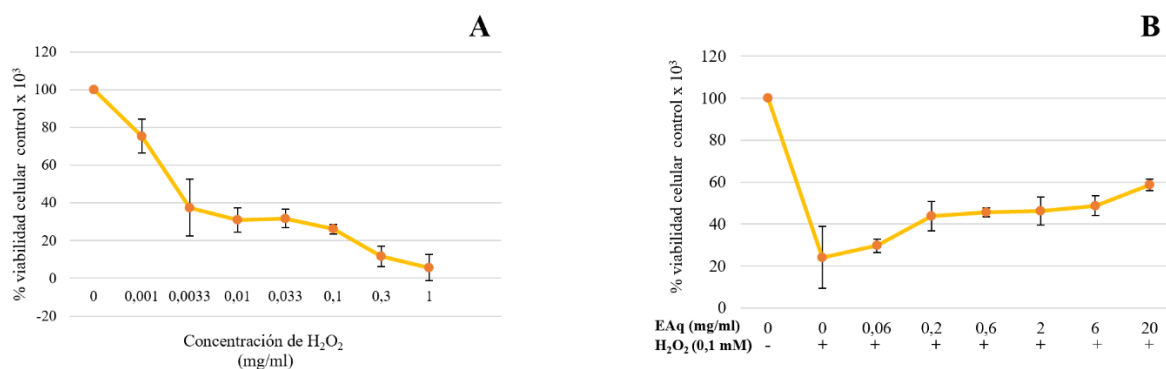


Figura 3. Estrés oxidativo inducido por peróxido de hidrógeno (H_2O_2) en células 3T3-L1 en presencia de extracto de *Durvillaea antarctica* (EAQ). (A) Viabilidad celular frente a estrés oxidativo inducido por H_2O_2 en células 3T3-L1. (B) Viabilidad celular frente a estrés oxidativo inducido por H_2O_2 en presencia de EAQ.

Con el fin de obtener información adicional sobre el mecanismo de protección del EAq frente al estrés oxidativo inducido por H_2O_2 , se estudió el efecto protector del EAq mediante tres marcadores fluorescentes específicos de daño celular: alamar blue, rojo neutro y CFDA-AM (5-carboxyfluorescein diacetato). Para ello, se replicaron las condiciones del ensayo protección anterior, induciendo muerte celular con H_2O_2 1 mM y protegiendo parcialmente del daño con un rango de concentraciones de EAq acotado al intervalo de máxima protección, esto es: 0,06 a 6 mg/mL de EAq. En la figura 4A se grafican las lecturas de alamar blue, el cual es un marcador que produce fluorescencia al ser reducido intracelularmente gracias a la actividad respiratoria de células metabólicamente activas, de manera que refleja la integridad de la función mitocondrial. Los resultados obtenidos evidencian que las células tratadas con H_2O_2 tienen una reducción de 40% en las unidades relativas de fluorescencia (URF), la cual fue parcialmente revertida de forma dosis dependiente con la administración de EAq, alcanzando una recuperación del 90% del control usando 0,2 mg/mL de EAq, lo cual representa el máximo nivel de recuperación sin mayor incremento a mayores concentraciones de EAq. En la figura 4 B se grafican las lecturas de fluorescencia de rojo neutro, el cual es un marcador que difunde al interior del lisosoma y es retenido en el organelo sólo en células viables. Coincidentemente, el EAq tuvo un efecto protector a nivel de la función lisosomal ya que logró revertir totalmente el daño inducido por H_2O_2 . En este sentido, la fluorescencia en presencia de H_2O_2 sin tratamiento con EAq, se redujo a un 65% con respecto al control (100%), y conforme se agregaron concentraciones crecientes del extracto, la protección fue aumentado hasta alcanzar a recuperar totalmente la señal de fluorescencia del control a una concentración de 0,2 mg/mL (figura 4B). Finalmente, el marcador CFDA-AM difunde al citosol celular donde es hidrolizado por esterases generando un producto fluorescente que queda retenido intracelularmente solo en células que presentan integridad de la membrana plasmática. En el ensayo con el marcador CFDA-AM, el extracto no efectuó una protección frente al daño de la membrana plasmática inducida por el tratamiento con H_2O_2 , sin importar la dosis de EAq usada (figura 4C). En conjunto estos resultados indican que el EAq contribuye a aumentar la viabilidad celular ante el estrés oxidativo mediado por H_2O_2 a través de la protección de la función respiratoria mitocondrial y la mantención de la integridad lisosomal, sin embargo, no contribuye significativamente a proteger frente a la pérdida de la integridad de la membrana plasmática.

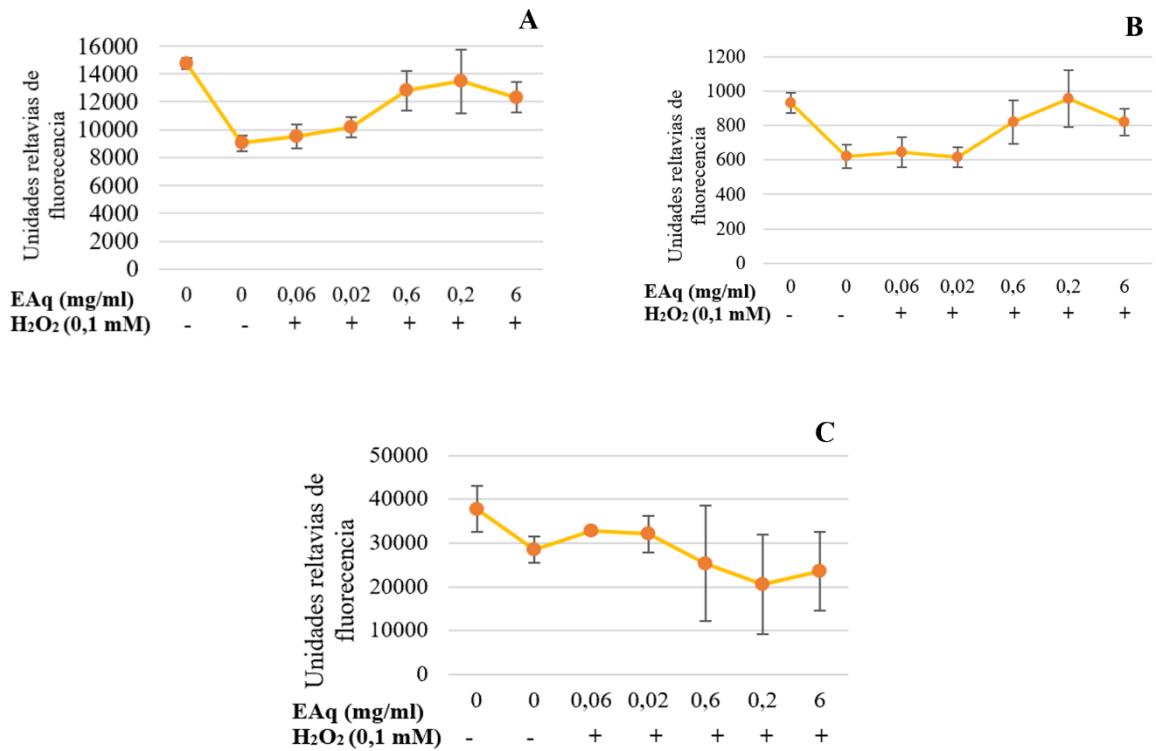


Figura 4. Actividad metabólica celular en estrés oxidativo inducido por peróxido de hidrógeno (H₂O₂) en presencia de extracto de *Durvillaea antarctica* (EAq). (A) Marcador fluorescente alamar blue; (B) Marcador fluorescente rojo neutro; (C) Marcador fluorescente 5-carboxyfluorescein diacetato (CFDA-AM). (-) Indica ausencia de H₂O₂; (+) Indica presencia de H₂O₂.

5.2 Efectos metabólicos del extracto en ratones BALB/c

5.2.1 Ajuste inicial de la dosis administrada a los ratones

Tras el análisis de la acción del extracto en la línea celular de preadipocitos de ratón 3T3-L1, donde no se observaron efectos citotóxicos en el rango de concentraciones utilizados, se prosiguió estudiando el efecto del EAq en un modelo *in vivo* de ratones BALB/c machos adultos de 15 semanas de edad. Particularmente, se sometió a los ratones a una dieta comercial alta en grasa (consumo ad-libitum) durante 10 semanas en conjunto con la administración de EAq para evaluar si este lograba revertir las alteraciones metabólicas inducidas por la dieta alta en grasa. La administración del EAq, se realizó mediante una sonda orogástrica dos veces por semana a cada animal, mientras que en los animales controles no tratados se homologó la intervención administrando agua por la misma vía. La dosis inicialmente administrada fue de 10 mg de EAq en 100 uL de agua, sin embargo, luego de una semana de tratamiento los animales tratados presentaron, en general, efectos adversos que incluyeron sensibilidad ocular con dificultad para mantener abiertos los ojos y dificultad para deambular observando lentitud de la marcha. Coincidentemente, uno de los animales tratados con EAq murió en este mismo periodo presentando necrosis generalizada desde la zona abdominal hasta las extremidades inferiores. En este animal se determinaron AST/GOT plasmática, urea y creatinina en plasma y orina en muestras obtenidas antes del deceso (tabla 3). Los niveles de GOT se observaron levemente aumentados respecto al rango de normalidad para la especie, sin embargo, se observó una gran elevación de creatinina y urea plasmática en orina, sugiriendo el desarrollo de una falla renal aguda.

Tabla 3. Resultados de análisis de muestras de suero y orina

Parámetro medido	Suero	Orina	Valores de referencia (Danneman <i>et al</i> , 2000; Silva-Santana <i>et al</i> , 2020)
Creatinina	1.85 mg/dL	8.37 mg/dL	0.5 – 0.8 mg/dl
Urea	345.5 mg/dL	701.6 mg/dL	40.48 mg/dl
AST/GOT	126 U/L		99.4 U/L

Para evitar los posibles efectos adversos potencialmente asociados a una dosis alta de EAq, se realizó una reducción de 5 veces en la dosis de EAq a partir de la segunda semana de tratamiento, es decir disminuyó a la dosis a 2 mg por ratón (equivalente a 66,6 mg/kg de peso para un ratón de 30 g de peso promedio). Tras la realización de este ajuste, se continuó con el tratamiento con extracto de *D. antarctica* 66,6 mg/kg de peso del animal entregado en dosis de 100 uL dos veces por semana vía sonda orogástrica hasta completar 10 semanas, en 4 condiciones experimentales diferentes: dieta normal sin extracto (N), dieta normal con extracto (NE), dieta alta en grasa sin extracto (G) y dieta alta en grasa con extracto (GE). A lo largo del experimento se midió peso corporal e ingesta de alimento semanalmente. Finalmente, se extrajeron muestras de suero, orina y tejido adiposo epididimal completo para conocer los efectos del extracto sobre los parámetros previamente mencionados.

5.2.2 Efecto del extracto sobre peso corporal y adiposidad.

En la figura 5A se observa el seguimiento del peso corporal medido semanalmente en los cuatro grupos experimentales. Al iniciar la intervención (semana 1), se observa que, en promedio, los distintos grupos de animales presentan un rango de 29 a 31 g de peso corporal inicial. Posteriormente durante el tratamiento, se observa una tendencia a la ganancia progresiva de peso corporal en los grupos con dieta normal (N) y dieta alta en grasa con EAq (GE), mientras que los grupos restantes (G y NE) presentan variaciones irregulares que incluyen aumentos y descensos en el tiempo. En la figura 5B se grafica el incremento de peso promedio en cada grupo desde el inicio al finalizar la intervención, observando que el grupo con dieta normal (N) tuvo un aumento de 1 gramo, mientras que el grupo alimentado con dieta normal y tratamiento con EAq (NE) tuvo una ganancia de peso igual a 0,7 gramos, lo cual no resultó estadísticamente significativo. Contrariamente a lo esperado, la dieta alta en grasa (G) indujo una ganancia similar a la dieta normal, mientras que la suplementación con EAq (GE) produjo un aumento significativo de peso sobre el control. Para evaluar si las variaciones en el peso corporal están relacionadas con ganancia de masa grasa, se determinó el peso del tejido adiposo epididimal (TAE) al finalizar la intervención. El TAE es un tejido adiposo blanco que se encuentra bien localizado alrededor de los testículos en los ratones macho, de manera su completa extracción y pesaje representa una medida de la abundancia de tejido adiposo blanco para ser comparado de un animal a otro. Los datos obtenidos, permiten comparar el TAE de todas las condiciones experimentales con respecto al control, en las que se evidencian diferencias significativas. Los grupos G y GE tienen el doble de peso de TAE que N ($p < 0,01$) que tiene un peso de 0,51 gramos, lo cual es concordante con el tipo de dieta que consumen. Por su parte el EAq logró una reducción del TAE en ratones alimentados con dieta normal, pero no en ratones alimentados con dieta alta en grasa (figura 5C). En el gráfico de la figura 5D, se presentan las variaciones en el peso del TAE como porcentaje del peso corporal por cada condición, observando que en los ratones alimentados con dieta alta en grasa el TAE alcanza hasta un 3% del peso corporal total, mientras que en los animales con dieta normal el TAE constituye entre el 1 y 1,5 %. En conjunto los datos de peso corporal y de tejido adiposo muestran que la dieta alta en grasa induce en ratones adultos, un aumento de peso corporal moderado debido principalmente a un aumento de la masa grasa. Por otro lado, en nuestras condiciones experimentales, el EAq no logra proteger frente a la acumulación de tejido adiposo inducida por una dieta alta en grasa.

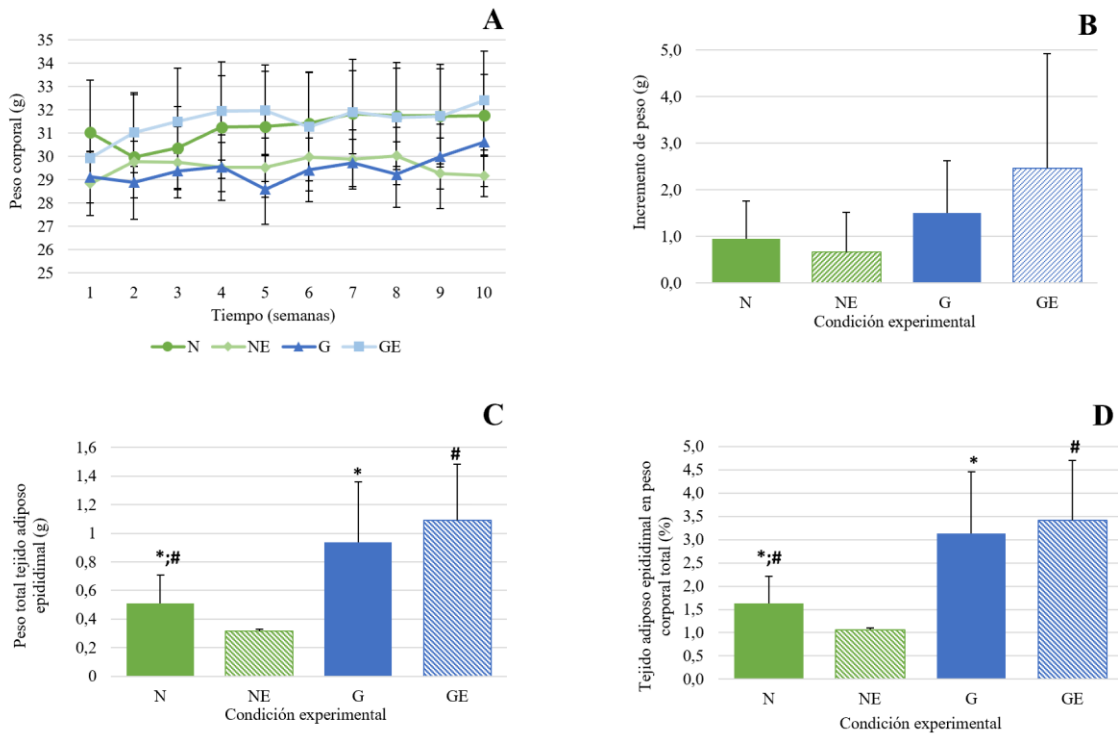


Figura 5. Efectos de extracto de *Durvillaea antarctica* (EAq) sobre parámetros de peso corporal y acumulación de tejido adiposo epididimal (TAE) por condición experimental. (A) Variación de peso corporal semanal por condición experimental. Sin diferencias significativas entre grupos según análisis es ANOVA; (B) Incremento de peso corporal promedio por condición experimental. Sin diferencias significativas entre grupos según análisis estadístico ANOVA; (C) Peso total TAE por condición experimental. * Diferencia significativa entre N y G ($p < 0,01$). # Diferencia significativa entre N y GE ($p < 0,01$), según análisis estadístico ANOVA. (D) Porcentaje de TAE en peso corporal total por condición experimental. * Diferencia significativa entre N y G ($p < 0,01$). # Diferencia significativa entre N y GE ($p < 0,01$), según análisis estadístico ANOVA. N: Dieta normal sin extracto; NE: Dieta normal con extracto. G: Dieta alta en grasa sin extracto; GE: Dieta alta en grasa con extracto.

5.2.3 Ingesta de energía y macronutrientes

Durante la intervención, se controló semanalmente la ingesta de alimento en todos los grupos de experimentación y se obtuvo el promedio de ingesta total en gramos por cada condición. En general, se observa un mayor consumo de alimento en los ratones alimentados con dieta normal que los alimentados dieta alta en grasa (figura 2A). El EAq indujo una disminución en el consumo de alimentos en los animales alimentados dieta normal, pero no hubo diferencias en los alimentados con dieta alta en grasa. Particularmente, se obtuvo una reducción significativa en la ingesta de alimento entre el grupo N y el grupo NE (177,8 g a 147 g; $p < 0,01$) siendo este último tratado con extracto, sin embargo, la ingesta de alimento del grupo G tuvo un consumo similar al grupo GE con extracto. La eficiencia alimentaria corresponde a la razón entre el peso corporal y la ingesta total de alimento y representa la capacidad del alimento de producir un incremento ponderal en el animal. Para determinar este parámetro, se utilizaron los valores de peso corporal final e ingesta total de alimento por condición experimental. En este sentido, el grupo control (N) es el que presenta una menor eficiencia alimentaria con un valor de 17,7. Condición que tiene una diferencia significativa ($p < 0,01$) con el grupo G, que presenta el valor doble de eficiencia alimentaria con 33,1. Esto indica que, ante igual consumo en gramos, la dieta alta en grasa logra un mayor aumento en el peso corporal respecto a la dieta normal. No obstante, al analizar el efecto del EAq sobre sus respectivos grupos controles, no se evidencian cambios significativos en la eficiencia alimentaria de la dieta normal ni la dieta alta en grasa (figura 6B).

Se analizó la ingesta energética total consumida por los animales, calculando el promedio de consumo por cada condición experimental. Conjuntamente se determinó el consumo promedio de cada macronutriente por condición experimental en base a la composición nutricional indicada por la respectiva dieta comercial. El grupo control (N) fue el que consumió una mayor cantidad de energía en kcal, con un consumo total en 10 semanas de 508 kcal, lo que difiere significativamente de lo consumido por el grupo NE que consumió un 80% respecto al control ($p < 0,01$). No obstante, el grupo G, alimentado con dieta alta en grasa sin extracto, tuvo una ingesta energética de 427,4 kcal; cifra significativamente inferior con respecto al control ($p < 0,01$) y similar a al consumo del grupo GE (figura 6C). Respecto a los datos de consumo de macronutrientes, estos confirman que los animales de los grupos G y GE consumieron casi el doble de lípidos a través de su dieta, al compararlo con el grupo control ($p < 0,01$). La distribución de los macronutrientes implica que la mayor cantidad de calorías provenía de los lípidos, ya que en la dieta normal tenemos solo un 7 % proveniente de grasas, mientras que en la dieta alta en grasa alcanzan un 45% (Figura 6D). Al comparar el grupo N y el grupo G, ambos sin tratamiento de extracto, evidenciamos el doble de consumo de proteínas y carbohidratos en el primero de ellos, lo que es significativamente mayor ($p < 0,01$) que en el segundo grupo, siendo la distribución de la molécula calórica es evidentemente diferente entre ambas dietas. (figuras 6E y 6F). En conjunto el análisis de ingesta de los animales indica que si bien los animales alimentados con dieta alta en grasa consumieron menor cantidad de alimento, el consumo energético fue similar al de la dieta normal debido a la mayor densidad energética de la dieta alta en grasa. Por otro lado, se observa que la administración del EAq no provoca cambios significativos en el consumo de alimentos, tanto en la dieta normal como en la alta en grasa.

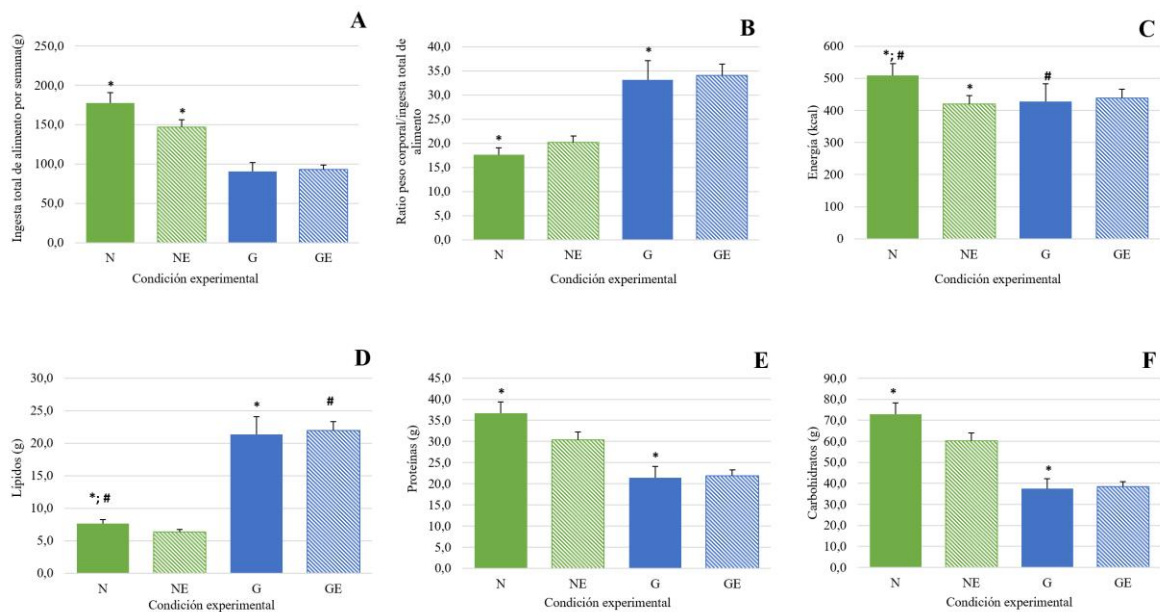


Figura 6. Ingesta total de alimento, energía y macronutrientes por condición experimental. (A) Ingesta total de alimento por semana por condición experimental. * Diferencia significativa entre N y NE ($p < 0,01$), según análisis estadístico ANOVA; (B) Eficiencia alimentaria por condición experimental. * Diferencia significativa entre N y G ($p < 0,01$), según análisis estadístico ANOVA; (C) Ingesta energética promedio por condición experimental. * Diferencia significativa entre N y NE ($p < 0,01$). # Diferencia significativa entre N y G ($p < 0,01$), según análisis estadístico ANOVA; (D) Ingesta de lípidos promedio por condición experimental. * Diferencia significativa entre N y G ($p < 0,01$). # Diferencia significativa entre N y GE ($p < 0,01$), según análisis estadístico ANOVA; (E) Ingesta de proteínas promedio por condición experimental. * Diferencia significativa entre N y G ($p < 0,01$), según análisis estadístico ANOVA; (F) Ingesta de carbohidratos promedio por condición experimental. * Diferencia significativa entre N y G ($p < 0,01$), según análisis estadístico ANOVA. N: Dieta normal sin extracto; NE: Dieta normal con extracto. G: Dieta alta en grasa sin extracto; GE: Dieta alta en grasa con extracto.

5.2.4 Efecto del extracto sobre lípidos plasmáticos

Al finalizar la intervención de 10 semanas se evaluó el efecto del EAq sobre lípidos plasmáticos en el suero de los animales, incluyendo triglicéridos y colesterol total. Los valores de colesterol total en suero no presentaron diferencias significativas entre las distintas condiciones experimentales. Al comparar el grupo NE con 70,8 mg/dL en relación con el control (N) con un colesterol total de 81,2 mg/dL, lo que solo representa un aumento de 13 % entre ambas condiciones, no siendo significativo. No obstante, el grupo G presentó niveles de colesterol total 30% mayor que los grupos con dieta normal, situación que se replica en el grupo GE. Con ello, se observa una tendencia en la que la dieta alta en grasa produce aumento de colesterol total en relación con la dieta normal (Figura 7A). Respecto a los niveles de triglicéridos, contrariamente a lo esperado se observó una tendencia a menores niveles de triglicéridos en animales sometidos a dieta alta en grasa en relación con animales con dieta normal. Por otro lado, el EAq indujo una reducción de los triglicéridos en animales tratados con dieta alta en grasa, pero no tuvo variaciones en animales alimentados con dieta normal. En conjunto, en los resultados de lípidos plasmáticos no se observan variaciones consistentes con una protección del extracto frente a los niveles de lípidos plasmáticos.

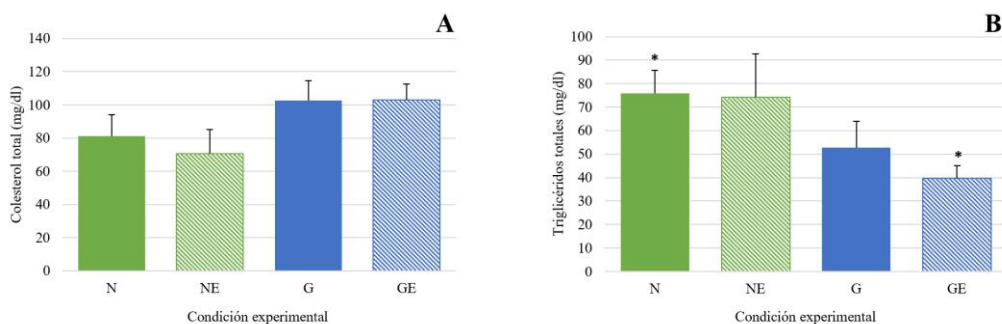


Figura 7. Niveles de lípidos en suero por condición experimental. (A) Niveles de colesterol total en suero promedio por condición experimental. Sin diferencias significativas, según análisis estadístico ANOVA; **(B)** Niveles de triglicéridos totales en suero promedio por condición experimental. * Diferencia significativa entre N y GE ($p < 0,01$), según análisis estadístico ANOVA. N: Dieta normal sin extracto; NE: Dieta normal con extracto. G: Dieta alta en grasa sin extracto; GE: Dieta alta en grasa con extracto.

5.2.5 Efecto del extracto sobre metabolismo glucídico.

Para evaluar la acción de EAq sobre el metabolismo glucídico, se llevó a cabo la medición de glicemia en ayuno con una frecuencia quincenal a partir de sangre de la cola de los animales. Desde esta perspectiva, no se encontraron diferencias significativas entre las condiciones experimentales, incluyendo la comparación entre la glicemia obtenida de entre la semana inicial y la final. En cualquier caso, al comparar los grupos N y NE, existe una reducción del nivel glicémico en la última semana de experimentación en 30% y 10% respectivamente. Lo anterior fue contrario a lo ocurrido en los grupos alimentados con dieta alta en grasa, los cuales aumentaron sus niveles de glicemia entre 36% y 60% observándose una diferencia significativa en el grupo G ($p < 0,01$), lo que se contrapone a lo sucedido con el grupo GE que obtuvo niveles de glicemia con un peak más bajo de glicemia que el antes mencionado (figura 8A). Para evaluar en mayor profundidad los posibles efectos del EAq sobre el metabolismo glucídico, se realizó una prueba de tolerancia a la glucosa en los ratones habiendo completado 8 semanas de su respectivo tratamiento. Para esta prueba, una sobrecarga de 30 mg de glucosa fue inyectada en un volumen de 0,1 mL de suero fisiológico vía intraperitoneal para luego determinar la glicemia en sangre de la cola cada 30 minutos durante 2 horas. La prueba de tolerancia a la glucosa en ratones alimentados con dieta normal mostraron glicemias basales menores a 100 mg/dL y elevaciones pequeñas a tiempos mayores con peaks menores a 150 mg/dL. Por el contrario, para los animales alimentados con dietas altas en grasa, la glicemia basal se elevó a 150 mg/dL y en las glicemias postcarga alcanzó un peak de 440 mg/dL en ratones con EAq (GS) y 540 mg/dL en ratones sin EAq (G). Se calculó el área bajo la curva para cada prueba de tolerancia, como una medida de integral de la respuesta glicémica a la sobrecarga de glucosa. En los grupos G y GS se observaron mayores valores de área bajo la curva en comparación al control con dieta normal (N), indicando que la dieta alta en grasa altera los mecanismos hipoglicemiantes normales relacionados con la respuesta a la insulina. Sin embargo, el tratamiento con EAq no indujo variaciones significativas en el área bajo la curva en los ratones alimentados con dieta normal ni en los alimentados con dieta alta en grasa. En conjunto, los resultados sugieren que en las nuestras condiciones experimentales, el extracto acuoso de *D. antarctica* no logra proteger a los animales de las alteraciones en el metabolismo glucídico, inducidas por la dieta alta en grasas en un modelo in vivo.

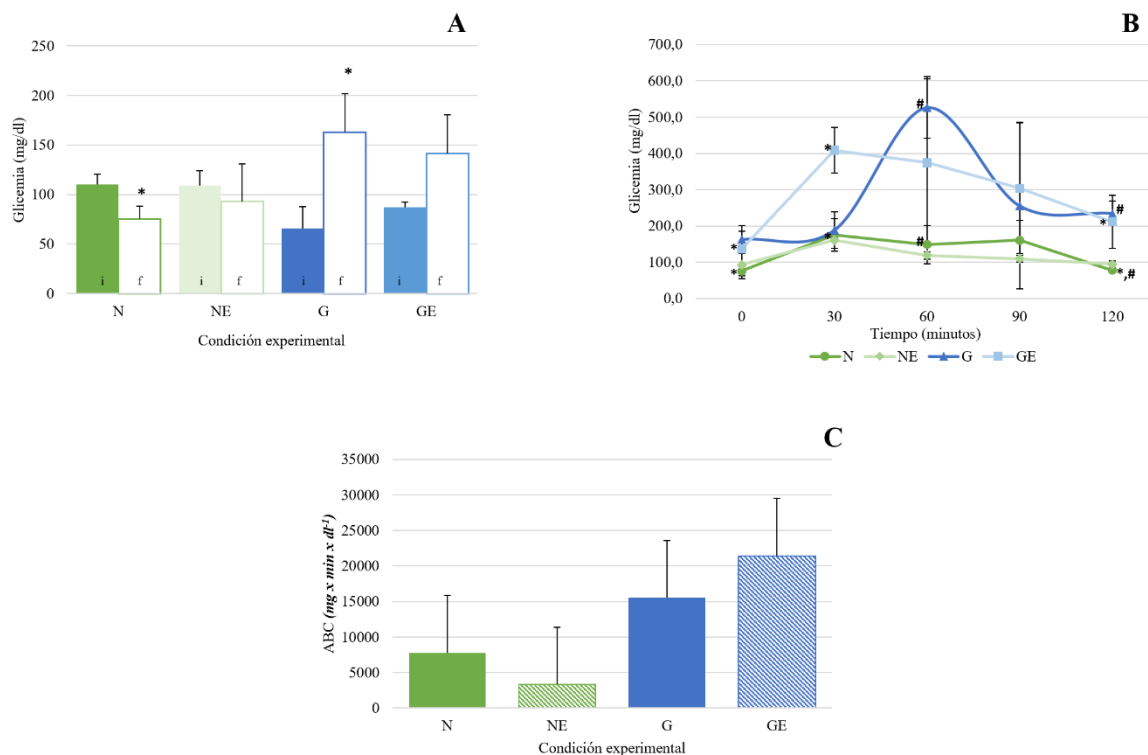


Figura 8. Indicadores de metabolismo glucídico por condición experimental. (A) Variación de niveles de glicemia al inicio y término de la experimentación. * Diferencia significativa entre N y G al finalizar la experimentación ($p < 0,01$), según análisis estadístico ANOVA. (i) glicemia inicial; (f) glicemia final; (B) Curva de tolerancia a la glucosa intraperitoneal por condición experimental. * Diferencia significativa entre N y G ($p < 0,01$). # Diferencia significativa entre N y GE ($p < 0,01$), según análisis estadístico ANOVA; (C) Valores de Área Bajo la Curva (ABC) por condición experimental. Sin diferencias significativas, según análisis estadístico ANOVA. N: Dieta normal sin extracto; NE: Dieta normal con extracto. G: Dieta alta en grasa sin extracto; GE: Dieta alta en grasa con extracto.

5.2.6 Efecto de extracto sobre TBARS en suero

La determinación de sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico (TBARS), permiten evidenciar la peroxidación lipídica, con la presencia de malonaldehído (MDA), un producto secundario de la peroxidación lipídica. De acuerdo con los resultados, la concentración de MDA se mantuvo constante en las 4 condiciones experimentales con valores de 10 y 11 nmoles/mg de tejido, lo que implica que no hubo una diferencia en la presencia de este producto de la peroxidación lipídica en ausencia o presencia del extracto de *D. antarctica*, lo que permite concluir que este extracto no posee la capacidad de reducir la peroxidación lipídica en suero.

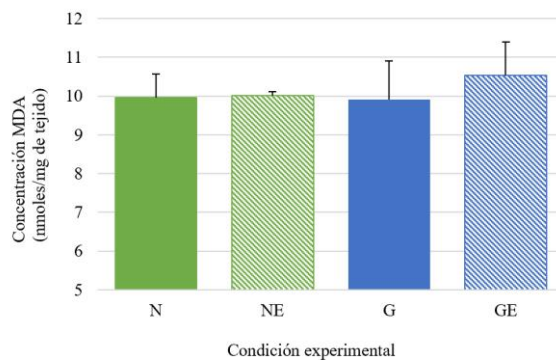


Figura 9. Determinación de sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico (TBARS) en suero por condición experimental. Sin diferencias significativas entre grupos, según análisis estadístico ANOVA. N: Dieta normal sin extracto; NE: Dieta normal con extracto. G: Dieta alta en grasa sin extracto; GE: Dieta alta en grasa con extracto.

5.3 Efecto agudo de infusión de *Durvillaea antarctica* sobre metabolismo de carbohidratos complejos.

La evidencia *in vitro* ha mostrado que compuestos solubles extraídos de *D. antarctica*, presumiblemente florotaninos, inhiben a la α -amilasa purificada. Para estudiar si estos compuestos pueden interferir con la digestión y absorción de carbohidratos complejos en humanos, realizamos un estudio randomizado cruzado (randomized controlled crossover trial) en 14 personas. Para ello se preparó una infusión de cochayuyo a partir de cochayuyo seco y pulverizado mecánicamente, sin ser sometido a procesos de ultrasonicación ni otras formas de extracción, con el fin de asegurar la mayor inocuidad para el consumo humano gracias a su mínimo grado de procesamiento. En el primer día del estudio, los participantes consumieron 100 mL de la infusión de cochayuyo e inmediatamente después, 100 g de pan blanco. Posteriormente, se realizaron mediciones de glicemia con glucómetro cada 15 minutos hasta completar 45 minutos de seguimiento luego de ingerido el pan. Cada participante repitió el procedimiento al día siguiente en las mismas condiciones, pero reemplazando el consumo de la infusión de cochayuyo por 100 mL de agua de la llave (Figura 10)

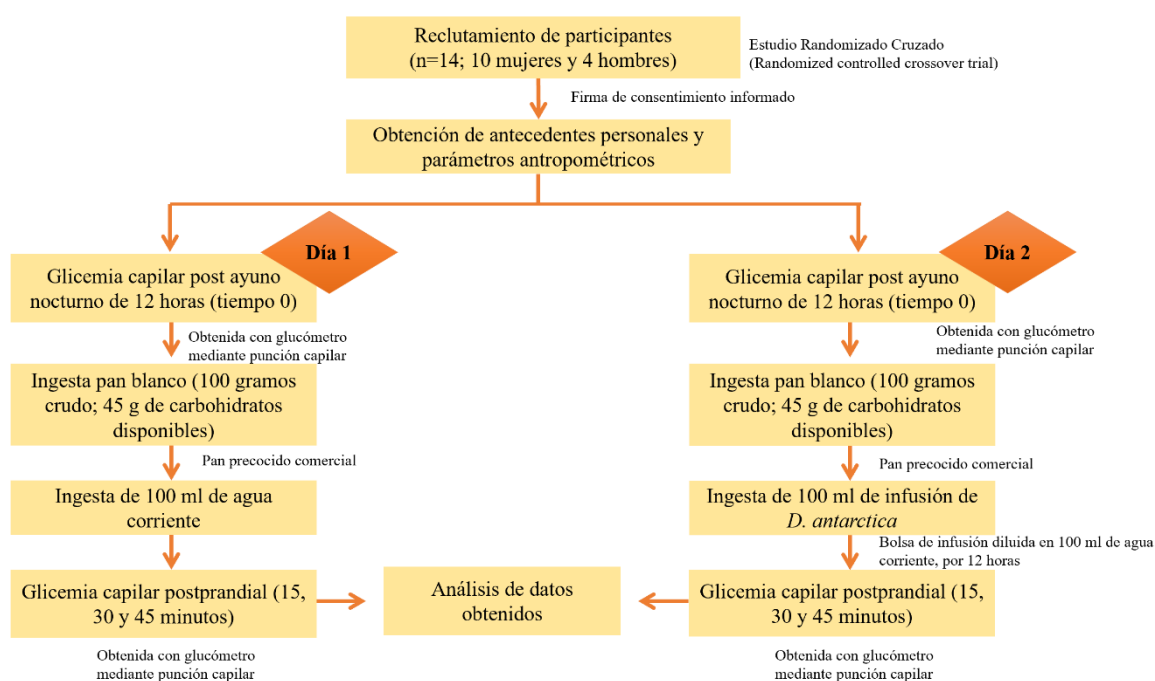


Figura 10. Procedimiento de estudio randomizado cruzado

Tabla 4. Características generales de los participantes

Parámetro	M (N=10)	H (N=4)	TOTAL (N=14)
Edad (años)	44, 1 ± 14,6	45,3 ± 20,0	44,4 ± 15,5
Estatura (mt)	156,4 ± 4,8	168,3 ± 5,9	159,8 ± 7,4
Peso corporal (kg)	73,6 ± 16,3	78,9 ± 7,8	75,1 ± 14,3
Masa grasa (kg)	28,2 ± 11,3	22,2 ± 6,2	26,5 ± 10,2
Grasa corporal (%)	37,0 ± 7,8	27,8 ± 5,2	34,4 ± 8,2
Perímetro de cintura (cm)	95,3 ± 15,9	88,7 ± 22,0	96,8 ± 14,4
IMC (kg/mt ²)	30,2 ± 7,2	27,9 ± 2,5	29,6 ± 6,2
Edad metabólica (años)	45,1 ± 21,8	45,3 ± 6,4	45,2 ± 18,8
TMB (kcal)	1431,7 ± 234,3	1693,7 ± 92,5	1497,2 ± 235,6
Glicemia basal (mg/dl)	107, 1 ± 18,9	99,5 ± 8,6	104,9 ± 16,6

Se presenta el promedio y desviación estándar para cada parámetro para el total de los participantes, de las mujeres (M) y los hombres (H). N corresponde al número de participantes.

Los 14 participantes seleccionados fueron individuos adultos sin diagnóstico de hipertiroidismo ni enfermedad renal, incluyendo a personas sanas o personas con diagnóstico de enfermedades metabólicas en control médico en cualquier estado nutricional (normal, sobrepeso u obeso). Diez de los participantes fueron mujeres y 5 hombres, siendo el rango de edad de 29 a 68 años, con un promedio de edad de 44 años. El grupo de mujeres presentó valores más elevados que los hombres en los parámetros de adiposidad, incluyendo mayor IMC (30,2 kg/m² v/s 27,9 kg/m²), mayor perímetro de cintura (95,3 cm v/s 88,7 cm) y mayor porcentaje de grasa corporal (28,2 % v/s 22,2 % - determinado a través de bioimpedanciometría). En total, los participantes presentaron un promedio de IMC de 29,6 kg/m², siendo su estado nutricional mayoritario de sobrepeso aproximándose a obesidad. En cuanto a parámetros metabólicos, la glicemia en ayunas determinada mediante de glucómetro arrojó un valor promedio de 104,9 mg/dL, una mayor tasa metabólica en hombres que en mujeres y una edad metabólica global de 45 años acorde con el promedio de edad biológica de 44 años.

En la figura 10A-C se presentan tres ejemplos de curvas de respuesta glicémica al pan comparando la respuesta control (curva verde) respecto a la respuesta luego del tratamiento con infusión de cochayuyo (curva azul) en el mismo individuo en dos días consecutivos. En el participante A, se muestra que la infusión de cochayuyo disminuyó 2,26 veces el área bajo curva (ABC) respecto al control; siendo esta la mayor disminución registrada entre todos los participantes. En B, se muestra un participante que no muestra incrementos de glicémica apreciables en respuesta al consumo de pan (ABC = 0 mg x dL x min), tanto en la intervención control como

en presencia de infusión de cochayuyo, de manera que el tratamiento no produjo variaciones apreciables. Por el contrario en C, el tratamiento con infusión de cochayuyo produjo una reducción del área bajo la curva de 2,11 veces bajo el control. El resto de los participantes obtuvieron curvas de respuesta glicémica cuya área bajo la curva en presencia de infusión y control se muestran en la figura 10D. Si bien, el tratamiento con infusión de cochayuyo produjo un efecto heterogéneo en la respuesta glicémica postprandial al pan, se observó que el efecto mayoritario fue inducir una disminución en la respuesta glicémica. Particularmente, se observa que en 5 la infusión provocó un aumento de la respuesta glicémica, mientras que en los 9 restantes hubo una disminución de la respuesta glicémica en presencia de la infusión. En promedio, se observó que el tratamiento de infusión de cochayuyo generó una respuesta glicémica de 784,8 mg x dL x min (SD = 600,5); mientras que el promedio de la condición control fue de 993,2 mg x dL x min (SD = 500,5) (figura 10E). Por lo tanto, la infusión de cochayuyo logro reducir en un 20 % la respuesta glicémica postprandial a carbohidratos complejos.

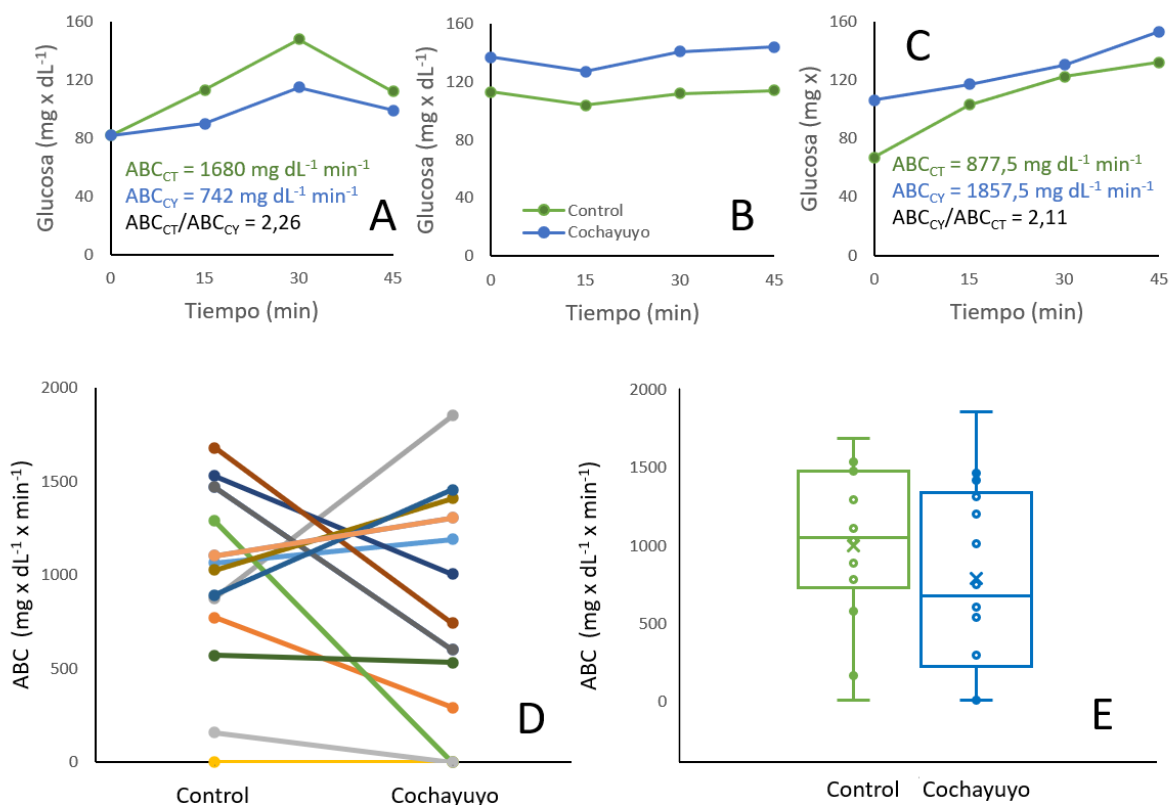


Figura 11. Efecto agudo de infusión de cochayuyo sobre metabolismo de carbohidratos complejos. A, B y C corresponden a respuestas glicémicas a 100 g de pan blanco previo al consumo de 100 mL de agua (control-curva verde) o 100 mL de infusión de cochayuyo (curva azul) en tres individuos seleccionados. En D se grafica el área bajo la curva (ABC) de las respuestas glicémicas al pan previa a la ingestión de agua (control) o infusión de cochayuyo. Las ABC de cada participantes se muestran en un color particular con línea que une la condición control respecto al cochayuyo. En E presentan las ABC de los participantes en gráfico de boxplot, indicando la promedio con “x” y mediana con línea horizontal.

6. Discusión

6.1 Efecto del extracto acuoso de *Durvillaea antarctica* en modelo celular de preadipocito.

Las algas marinas son una fuente importante de nutrientes como proteínas, ácidos grasos esenciales como EPA y DHA, fibra dietética y compuestos bioactivos como ficobiliproteínas, fucoxantina, fucoidanos y florotaninos, los cuales han reportado actividades antiinflamatorias, antidiabéticas, antihipertensivas, inmunomoduladoras y antioxidantes. Particularmente, florotaninos aislados de algas pardas como el dieckol, reportan en ensayos *in vitro* e *in vivo* actividades beneficiosas para la salud como disminución de peso corporal, reducción de glicemia, colesterol y menor actividad de proteínas que desencadenan la adipogénesis. Sin embargo, este tipo de extracto no está disponible en Chile, pues se extrae de algas como *Ecklonia spp.* endémicas de costas japonesas y coreanas. Por lo tanto, es posible suponer que este tipo de florotaninos pueden presentarse en otras especies de esta misma taxonomía, como es el caso de *Durvillaea antarctica*.

De acuerdo con los resultados obtenidos, el extracto acuoso de *D. antarctica* (EAQ) utilizado no presenta citotoxicidad para células del tipo 3T3-L1 de preadipocitos de ratón, la que ha sido estudiado mediante el ensayo de viabilidad celular con azul tripán, y en la cual, a concentraciones de 10, 20 y 40 mg/mL de extracto, la viabilidad alcanzó el 106%, descartando citotoxicidad sobre células adiposas. De la misma manera, el estudio de Pacheco *et al.*, 2020, utilizó extractos de *D. antarctica* obtenidos con acetona y otro con etanol, y se demostró que en la línea celular HT-29 de adenocarcinoma humano no presentaba toxicidad a concentraciones crecientes, y con 24 y 48 horas de incubación (Pacheco *et al.*, 2020). De igual modo este tipo de ensayos se replica en estudios realizados en extractos de otros tipos de algas como los de florotaninos aislados de *Ecklonia cava*, como el dieckol, que, en el estudio de Choi *et al.*, 2015 se sometió al mismo ensayo de viabilidad celular, resultando seguro para su utilización en células 3T3-L1 (Choi *et al.*, 2015). En resumen, el extracto de esta tesis y los estudiados en literatura, no presentan efectos tóxicos agudos en ensayos *in vitro*, lo cual es una evidencia importante previo al uso del extracto en seres vivos.

Con respecto a la acción del extracto EAQ sobre la proliferación de células 3T3-L1, se estudió en cultivos preconfluentes a concentraciones crecientes de extracto más un control sin tratamiento, el cual se consideró con proliferación 100%. Mediante ensayo de exclusión azul de tripán se determinó la cantidad de células viables tras el tratamiento, y se obtuvo como resultado una menor proliferación de estas células preadipocíticas en presencia de concentraciones de extracto, a saber: 0,2, 6 y 20 mg/ml, los cuales redujeron la proliferación en 19, 54 y 60% de los preadipocitos, reduciendo la cantidad total de adipocitos en el cultivo. En el caso de otros estudios, como el de Choi *et al.*, 2015, se realizó un ensayo con azul de tripán, con el fin de determinar el porcentaje de proliferación celular de los adipocitos ya diferenciados en presencia y ausencia de dieckol, y se evidenció un incremento en la proliferación en aquellos no tratados, y una inhibición de la misma en presencia de extractos purificados que fue aumentando en la medida que aumentaba la cantidad de extracto, lo cual suprimió el incremento de las células en 80% aproximadamente en concentraciones de 50 μ M y 100 μ M de

dieckol. Al contrastar ambos resultados, se desprende que los extractos de algas *Pheophytas*, pueden retrasar la proliferación celular no solo de preadipocitos sino que también después de la diferenciación, lo cual permite contrarrestar la hiperplasia del tejido adiposo. Este efecto podría tener repercusiones metabólicas negativas ya que disminuye la disponibilidad de adipocitos para almacenamiento de energía, lo cual podría favorecer la acumulación ectópica de lípidos en tejido muscular o hepático, en presencia de una dieta hipercalórica y rica en grasas. Se ha demostrado que lo anterior se asocia a resistencia a la insulina, propiciando la aparición de enfermedades metabólicas.

La cuantificación de polifenoles totales realizado en el EAq previo a su utilización en la presente investigación, resultó en un contenido total de fenoles de 9.8 ± 0.4 mg/g de ácido gálico en 100 gramos peso seco, valor que es superior al presentado en algas propiamente tales como *Ulva lactuca* que contiene 2.86 ± 0.04 mg/g de ácido gálico en 100 gramos peso seco, y contiene el doble que el alga parda *Undaria pinnatifida* (wakame) común de las costas coreanas (Peñalver *et al*, 2020). De igual manera, al comparar nuestro extracto con extractos etanólicos y acetónicos de *D. antarctica*, se obtienen 7,4 mg/g ácido gálico en peso seco para el primero y 6.7 mg/g de ácido gálico para el segundo, lo que indica que nuestro EAq sigue teniendo más polifenoles a pesar del acuoso utilizado para la extracción. (Pacheco *et al*, 2020). Dado que los extractos acetónicos revisten mayor peligro para su uso en seres humanos ya que pueden arrastrar trazas de acetona, nuestro EAq empleado en nuestro estudio presenta buen potencial para uso en humanos por su naturaleza acuosa y alta concentración de polifenoles totales. En especial, si se considera la presencia de florotaninos dentro de esos polifenoles, que en algas pardas como *Ascophyllum nodosum*, que tienen una concentración de 20 a 250 mg de florotaninos por gramo de peso seco y cuya cantidad de polifenoles rodeaba el 14% en 100 gramos de peso seco (Peñalver *et al*, 2020). Esto permite suponer que algas como *D. antarctica*, pueden contener una cantidad no despreciable de florotaninos, incluido el extracto utilizado en esta investigación, lo que da como resultado actividades biológicas tales como antitumorales, antiproliferativas y antioxidantes, documentadas en otras especies de algas de la misma taxonomía.

La actividad antioxidante sobre células 3T3-L1 fue evaluada en un ensayo de estrés oxidativo inducido por peróxido de hidrógeno (H_2O_2), el cual es una especie reactiva del oxígeno (ROS) que se genera intracelularmente por procesos celulares, y que es capaz de atravesar membranas celulares, pudiendo inducir estrés oxidativo y desencadenando muerte celular (Kang *et al*, 2012). Esta molécula altamente reactiva, se empleó en la investigación a una concentración de 0,1 mM la cual fue suficiente para reducir a 30% la viabilidad celular. Conjuntamente, se trató las células con concentraciones crecientes de EAq y se realizó un ensayo de viabilidad celular para estudiar el efecto protector de EAq sobre las células con estrés oxidativo. Los datos obtenidos indican que el EAq a 20 mg/ml, aumentó la viabilidad en más de 50%, mostrando una tendencia clara de protección al estrés oxidativo, lo cual puede deberse a múltiples factores y componentes del extracto, enfatizando en la posible concentración de florotaninos presentes en el. Coincidentemente, un estudio realizado por Kang *et al*, 2004, evaluó la actividad inhibitoria de extractos de distintas especies de algas, incluyendo *Ecklonia stolonifera*, en homogenizados de riñón de ratas wistar, utilizando el indicador diacetato de 2',7'-diclorodihidrofluoroceína (DCFDA). Los resultados obtenidos en este estudio, demostraron inhibición de ROS

por parte de tres algas específicas: *Ulva pertusa* (*Chlorophyta*), con más del 80% de inhibición, seguida de *Symphocladia latiusca* (*Rodhophyta*) que inhibió en alrededor de 50% la formación de ROS y por último, *Ecklonia stolonifera* (*Pheoahyta*), que presentó una inhibición de 45% aproximadamente de la generación de ROS. De manera simultánea, se evaluó la capacidad “secuestradora” de ROS totales, por parte de florotaninos aislados de extracto metanólico de *Ecklonia stolonifera*, incluyendo cinco florotaninos aislados (floroglucinol, eckstonol, eckol, florofucofuroeckol A y dieckol), donde aquellos que mostraron una capacidad de secuestrar ROS similar al control positivo Trolox (IC₅₀= 5,70 uM), fueron eckol y florofucofuroeckol A, con un IC₅₀ de 4,04 uM y 3,80 uM, respectivamente (Kang *et al*, 2004). Otra investigación realizada en algas pardas, dentro de las cuales se encuentra *Ecklonia cava*, demostró potencial antioxidante de extractos obtenidos de proteasas y enzimas degradadoras de carbohidratos, el cual tuvo mayor capacidad de secuestrar peróxido de hidrógeno de manera *in vitro*, con valores que alcanzaban el 60 a 90% de la inhibición, lo que superaba a antioxidantes comerciales como α -tocoferol, BHA y BHT que no superaban el 70% de inhibición (Heo *et al*, 2005). Por lo anterior, se puede indicar que la capacidad de disminución de la actividad de H₂O₂, evidenciada tras la utilización de EAq, está directamente relacionada con su contenido de polifenoles, y al mismo tiempo, de florotaninos, ya que los estudios descritos previamente, reportan que las algas marrones son recursos ricos en antioxidantes de este tipo. Una investigación reciente, publicada en 2022 por Shih, *et al.*, estudió el potencial antioxidante de extractos enzimáticos de *Durvillaea antarctica*, identificados como *Dur-A*, *Dur-B* y *Dur-C*. Dentro de estos extractos, se apreció un contenido importante de polisacáridos sulfatados de fucosa (fucanos o fucoidanos), a los cuales se les atribuye la actividad antioxidante presente en los extractos. Por esta razón, se llevaron a cabo ensayos con radical DPPH, catión radical ABTS y actividad quelante de ion ferroso. Para la actividad secuestradora de DPPH, todos presentaron actividad inhibitoria de manera dosis dependiente, pero *Dur-B* fue el que presentó mayor actividad con un IC₅₀ de 3,78 mg/ml, seguido de *Dur-A* (IC₅₀= 5,60) y finalmente, *Dur-C* (IC₅₀= 7,52). La situación cambia, al analizar la capacidad secuestradora de catión radical ABTS, en la que *Dur-A* es destacado por tener mayor eficacia que los demás extractos (IC₅₀=0,36), aunque no existe una diferencia significativa entre este y *Dur-B*, y finalmente, en la actividad quelante de ion ferroso, vuelve a destacar *Dur-B* (IC₅₀=1,55 mg/ml). Por este motivo, se señala a este extracto como el de mayor actividad antioxidante, pero sin dejar de concluir que todos ellos la tienen solo que en menor cantidad. Esta información es relevante en la presente investigación, dado que entregan nuevos antecedentes de la composición química de *Durvillaea antarctica* y la actividad antioxidantes de estos compuestos específicos. Por lo tanto, es posible que la presencia de fucoidanos esté asociada a las actividades antioxidante que demostró nuestro extracto frente a estrés oxidativo inducido por H₂O₂. A pesar de que nuestro EAq y los extractos *Dur-A*, *Dur-B* y *Dur-C* son obtenidos de la misma especie de alga, se debe tener en cuenta que la composición química y nutricional de las algas varía frente diversos escenarios ambientales, y que los distintos protocolos de extracción generarán extractos con diferente contenido y abundancia de compuestos bioactivos.(Shih *et al*, 2022).

6.2 Efectos del extracto acuoso de *Durvillaea antarctica* en ratones BALB/c adultos

De igual modo, esta investigación buscó relacionar la administración de EAQ en ratones BALB/c vía sonda orogástrica, con actividades como control de peso corporal, mantención de niveles de glicemia, y lípidos en suero, además de actividad antioxidante. En primera instancia, se realizó una medición de peso corporal dos veces a la semana, la cual permitió extraer valores de peso corporal semanal por condición experimental, a saber: N (dieta normal sin extracto), NE (dieta normal con extracto), G (dieta alta en grasa sin extracto) y GE (dieta alta en grasa con extracto). Los resultados obtenidos documentan un aumento de peso sostenido a través de las 10 semanas de tratamiento, siendo más notorio el aumento de los grupos con dieta alta en grasa, produciéndose una diferencia significativa entre NE y GE, lo que indica que el EAQ no fue suficientemente efectivo para revertir el aumento de peso corporal asociado a la dieta alta en grasa. Ahora bien, al comparar el grupo NE con su control (N), presentó menor ganancia ponderal, lo que implica que EAQ tiene un efecto sobre aquellos grupos con dieta normal pero no en los alimentados con dieta alta en grasa. Lo anterior, podría relacionarse con que la cantidad de extracto administrada no fue suficiente para revertir la acción de una dieta alta en grasa, pero sí una de menor contenido graso (dieta normal). Al contrastar estos resultados, con el estudio de Choi *et al*, 2015., se puede evidenciar que en este último, al suplementar a los animales con extracto de florotanino aislado diariamente, se produjo una reducción de peso corporal final de 35% con respecto al control, con una dosis de 60 mg/kg de peso corporal/ día, y la ganancia de peso fue de 38% en 10 semanas de tratamiento, mientras que el control sin tratamiento tuvo un aumento de peso de casi el doble del peso inicial. Estos resultados difieren de los obtenidos en la presente investigación, pues en este caso el incremento de peso fue mayor en aquellos grupos con dieta alta en grasa con un incremento promedio de 7% en el grupo tratado con EAQ, lo que indica que el extracto en sí mismo no implicó una reducción de peso corporal o protección frente al aumento de peso asociado a una dieta con altas cantidades de grasa. Aun cuando se entregó una cantidad superior de EAQ por dosis (66,6 mg/kg de peso), esta administración no era diaria como en la investigación de Choi *et al*, 2015, el cual incluyó el florotanino purificado en el alimento. A causa de estas diferencias, también sorprende que los animales utilizados en la investigación de Choi *et al*, tuvieran un peso final de 60 gramos mientras que en la presente solo alcanzaron un peso promedio de 30 gramos, lo cual puede estar asociado a la cepa de ratón utilizado. En este sentido los ratones BALB/c no se caracterizan por sufrir un gran aumento ponderal en respuesta a dieta alta en grasa, pero si por el incremento del tejido adiposo blanco.

En nuestro estudio, se controló la ingesta de alimento de los animales tres veces por semana obteniéndose la ingesta de alimento promedio con respecto a cada grupo experimental. Con estos datos, se evidenció que los animales con dieta alta en grasa (G y GE) tuvieron un consumo de alimento inferior que los con dieta normal (N y NE), con una diferencia marcada entre los grupos tratados con EAQ, donde NE tuvo un consumo total promedio de 180 g (aproximadamente) y GE de alrededor de 150 gramos. Aunque estos, valores son el consumo total durante las 10 semanas de experimentación, adicionalmente se puede considerar la cantidad de alimento consumida diariamente por animal de acuerdo con su condición experimental. Esta fue diferente considerando el tipo de alimento ingerido, de esta manera, aquellos alimentados con dieta normal (N y NE) consumieron

entre 5.1 y 5.3 gramos por día, mientras que los alimentados con dieta alta en grasa (G y GE) consumieron 3.2 y 3.3 gramos por día, valores que al ser comparados son alrededor de un 40% menores que los con dieta normal. Al realizar la comparación con los animales de experimentación de Choi *et al.*, 2015, estos consumieron una mayor cantidad de alimento (6 gramos, aproximadamente) en todos los grupos experimentales, incluyendo el grupo control con dieta normal y los grupos con dieta alta en grasa, por lo que la presencia o ausencia de tratamiento con dieckol, no implicó un menor consumo de alimento, al igual que en nuestro estudio. De igual manera, se analizó la eficiencia alimentaria, que corresponde al ratio entre peso corporal total/ ingesta total de energía, y se define como la capacidad de los alimentos de producir un aumento de peso en los animales. Este valor es superior en los grupos G y GE, lo cual es esperable pues se trata de alimento alto en grasa que tendrá una capacidad superior para propiciar el aumento de peso, y conjuntamente, en el estudio de Choi, los animales con dieta alta en grasa sin tratamiento de extracto tuvieron la mayor eficiencia alimentaria. Contrariamente, el grupo tratado con dieta alta en grasa y 60 mg/kg de peso/día de dieckol tuvo un 45% menos de eficiencia alimentaria que aquel alimentado solo con dieta alta en grasa. Pero, al compararlo con nuestro estudio, no se reflejó una disminución de este parámetro asociado a la administración de EAq, lo cual evidencia que al ser un extracto no purificado, probablemente la cantidad de florotaninos existentes no sea suficiente para disminuir la eficiencia alimentaria y en suma, las dosis administradas fueron insuficientes para producir efectos.

Ahora bien, con respecto a los depósitos de tejido adiposo, se extrajo el tejido adiposo epididimal completo de los ratones investigados, el cual fue pesado al momento de su extracción, y a partir de las cifras obtenidas se obtuvo el peso promedio del tejido epididimal por condición experimental. La data obtenida, indica que los grupos G y GE, tuvieron un mayor peso de este tejido con valores de 0,94 y 0,98 gramos, respectivamente, cifras que representan el doble del peso del grupo control, no existiendo diferencias entre los grupos tratados y no tratados con EAq. Esto concuerda con la investigación de Kang *et al.*, 2013, en que se utilizó un extracto de la microalga diatomea *Phaeodactylum tricornutum*, que se reporta como una buena fuente del carotenoide fucoxantina, el cual ha demostrado tener actividades antioxidantes y antiobesogénicas. Por esta razón, el estudio buscó investigar la acción protectora de un extracto de esta microalga, frente a una dieta alta en grasa en ratones C57BL/J6 de 4 semanas de edad. Con una dosis de 0,7% de extracto administrada en el pellet alto en grasa consumido *ad libitum* por 8 semanas, y se contó con otros dos grupos experimentales, uno con dieta normal sin extracto, y otro con dieta alta en grasa sin extracto. Dentro de los parámetros evaluados, al igual que en nuestro estudio, se midió peso corporal total, ingesta de alimento, eficiencia alimentaria y peso de tejido adiposo epididimal. Dentro de los resultados más relevantes, se evidencia que el peso corporal total y peso de tejido epididimal fue mayor en los animales alimentados con dieta alta en grasa sin extracto, lo que se replica la presente investigación. En cuanto al consumo de alimentos, este no se vio diferenciado entre los 3 grupos experimentales, lo que está en discrepancia con lo obtenido en nuestro estudio, en que los animales con dieta alta en grasa ingirieron una menor cantidad de alimento, valores que bordearon los 3 gramos por día y que son similares a los obtenidos en la investigación de Kang. En cuanto a la eficiencia alimentaria, fue elevada en los grupos con dieta alta en grasa e inferior en el grupo con dieta normal, que es lo mismo ocurrido en nuestra experimentación. Contrariamente, el tratamiento con extracto de esta microalga, tuvo un efecto protector frente

al aumento de peso en presencia de una dieta alta en grasa y una menor acumulación de tejido adiposo epididimal, algo que no se vio reflejado con EAq. Kang *et al.*, atribuye estas bioactividades a la presencia de fucoxantina, el cual es un carotenoide que está presente en las algas pardas, sin embargo se desconoce la cantidad presente en nuestro extracto, y esto podría repercutir en que los resultados no fueran los esperados. Además el estudio de Kang difiere en cuanto a la vía y periodicidad de administración de extracto respecto a nuestro estudio.

Así mismo, se examinó los niveles de colesterol total y triglicéridos en suero de los ratones BALB/c experimentales. Los valores resultantes indicaron un nivel de colesterol total 30% mayor en el grupo GE con relación a el grupo N y NE. A pesar de esto, no existió una diferencia significativa entre ellos, y tampoco se observó una reducción de colesterol total en aquellos grupos tratados con EAq (NE y GE). Siguiendo esta línea, la investigación de Kang *et al.*, 2013, presentó niveles mayores en colesterol total, pero al igual que en nuestro estudio, no hubo diferencias significativas entre grupos, por tanto se desprende que al suministrar el extracto de la microalga *Phaeodactylum tricurnutum* no hubo una prevención del aumento de los niveles de colesterol total en presencia de una dieta alta en grasa. En discordancia con estos resultados, en la investigación de Choi *et al.*, 2015, si se presentó una reducción del colesterol total en presencia de dieckol en 60 mg/kg de peso día la cual fue significativa con respecto al control de dieta alta en grasa sin extracto, presentándose como protector frente al incremento de los lípidos en suero. Lo cual indicaría, que el dieckol, pero no la fucoxantina, podría estar asociado a un rol hipocolesterolemante. Sin embargo, el extracto de esta investigación (EAq) no posee la efectividad suficiente para producir un cambio en los niveles de colesterol en frente a una dieta alta en grasa.

Con respecto a los triglicéridos en suero cuantificados en nuestros animales de experimentación, se vieron niveles menores en los animales con dieta alta en grasa, los cuales fueron significativamente menores ($p < 0,01$) en relación a los con dieta normal. En el caso de ambas investigaciones, tanto la de Kang como la de Choi, se presentó una disminución de los triglicéridos en presencia de tratamiento con extractos de algas, lo que es similar a lo obtenido por nuestro estudio, y permite asociar estos extractos con una protección al aumento de triglicéridos desmedido, en presencia de una dieta alta en grasa.

En otras investigaciones, se ha evaluado la acción de extractos de algas pardas sobre el metabolismo glucídico en ensayos *in vitro* e *in vivo*. De manera particular, se ha establecido un mayor interés en los florotaninos, y su capacidad de disminuir los niveles de glicemia postprandial. Esta actividad biológica se desencadena por la inhibición de α -amilasa y α -glucosidasa, enzimas claves en la absorción del almidón, que representan un blanco terapéutico para promover el control de el signo característico de la diabetes: la hiperglicemia. Por ello, y considerando que EAq se obtuvo de un alga marrón, se midió los niveles de glicemia de los animales de experimentación al inicio y término del tratamiento con EAq, en todos los grupos experimentales, esto con la finalidad de evidenciar una eventual actividad protectora frente a hiperglicemia ocasionada por una dieta alta en grasa. Los datos mostraron niveles de glicemia menores en los grupos alimentados con una dieta normal, en presencia y ausencia de extracto, y la variación entre los niveles de glicemia de la primera y la décima semana no fueron significativas. Contrariamente, el incremento de los niveles de glicemia a la décima semana de

tratamiento en los grupos alimentados con dieta alta en grasa fue significativo, de manera explícita en el grupo G, donde se produjo un aumento de 60% del nivel de glicemia con respecto a la glicemia inicial. Si bien, en el grupo GE se produjo un incremento en los niveles de glicemia, al finalizar la experimentación, esta no fue tan marcada como la del grupo G, ya que solo representó un 36%, lo cual no fue estadísticamente significativo, resultado que hace posible asociar un rol protector al incremento de los niveles de glicemia con el tratamiento de EAq. De manera paralela, se realizó una prueba de tolerancia a la glucosa en los ratones macho BALB/c en la semana final de la experimentación, con una carga de glucosa vía intraperitoneal, que arrojó las áreas bajo la curva (ABC) por cada condición experimental. Las ABC de los grupos con dieta alta en grasa (G y GE), fueron significativamente más altas que los grupos alimentados con dieta normal, verificando que el consumo de una dieta alta en grasa, produce hiperglicemia según se ha reportado previamente. Al realizar el contraste entre nuestros resultados y los de Lee *et al.*, 2010, este último analizó los niveles de glicemia postprandial en ratones ICR macho de 6 semanas con inducción de diabetes con streptozotocina en presencia y ausencia de dieckol (100 mg/kg de peso) tras una carga oral de almidón soluble. Se apreció en sus resultados que el incremento de glicemia postprandial se suprimió de manera significativa en aquellos que recibieron el dieckol de forma oral, antes de la carga de almidón, en comparación con los ratones diabéticos no tratados. De manera anexa, en los animales sin diabetes, tratados con extracto de dieckol, se suprimió la hiperglicemia postprandial causada por el almidón, lo cual difiere de nuestro estudio, ya que en animales sin tratamiento de dieta alta en grasa, no hubo mayores cambios en la glicemia en presencia o ausencia de EAq. Esto tiene concordancia, con los resultados obtenidos por Kang *et al.*, 2013, donde indagó el comportamiento de los niveles de glucosa en sangre en presencia y ausencia de extracto de dieckol (florotanino aislado), con una administración de este de 10 mg/kg de peso y 20 mg/kg de peso en ratones C57BL/KsJ-db/db machos de 9 semanas a través de inyección intraperitoneal por 14 días. Dicho esto, los resultados obtenidos en este estudio indicaron que los grupos tratados con extracto tuvieron menores niveles de glicemia postprandial en comparación al control, no mostrando dependencia a la dosis entregada. En este sentido, nuestra investigación no obtuvo los resultados esperados de reducción de la glicemia postcarga, lo cual puede estar relacionado a múltiples condiciones, como es el caso del tipo de dosis, tipo de extracto, entre otros. En este contexto, los estudios antes mencionados, atribuyen la capacidad inhibitoria del aumento de glicemia postprandial al florotanino aislado dieckol (disponible en *Ecklonia cava*), que adicionalmente, ha sido estudiado de manera *in vitro*, como inhibidor de las enzimas α -amilasa y α -glucosidasa, llegando incluso a tener mayor eficacia del inhibidor enzimático comercial α -glucosidasa, acarbosa. De igual manera, Moon *et al.*, 2011, estudió el potencial inhibidor de las algas marrones *Ecklonia stolonifera* y *Ecklonia bicyclis*, las que también tuvieron mayor potencial inhibitorio que la acarbosa. Por tanto, el mecanismo de reducción de la hiperglicemia, se relaciona con la capacidad inhibitoria de los compuestos bioactivos de este tipo de algas. El estudio de Pacheco *et al.*, 2020, ha reportado que los polifenoles contenidos en diferentes algas de nuestra costa, incluyendo la de nuestro interés (*Durvillaea antarctica*), tienen capacidad inhibitoria de las enzimas implicadas en la degradación y posterior absorción de los carbohidratos, mostrándose como una alternativa nutraceutica atractiva, debido a la cantidad de efectos secundarios provenientes de inhibidores comerciales de estas enzimas, como acarbosa. Es así como los resultados de dicho estudio, señalaron una capacidad inhibitoria de α -glucosidasa que casi alcanzaba el 100% en 1000 ug/mL de

extracto acetónico de *Durvillaea antarctica*, lo cual es superior a lo demostrado por acarbosa en la misma concentración (alrededor de 40% de actividad), y de igual modo, se mostró esta alga como inhibidora de α -amilasa, aunque con una inhibición al 56% aproximadamente. Esto propone que los extractos utilizados en este estudio son utilizables para el manejo terapéutico de la hiperglicemia, asociando su capacidad inhibitoria al control de este signo clave de la patología diabética. Un segundo estudio, que analizó extractos de esta misma alga, señaló la capacidad inhibitoria de estas mismas enzimas de tres tipos diferentes de extractos, alcanzando alrededor de 60 % para α -glucosidasa por parte de *Dur-C* y casi el 70% para α -amilasa por parte de *Dur-B*, lo que se atribuye a la presencia de polisacáridos sulfatados (fucoidanos) en estos extractos. A la luz de estas investigaciones, es oportuno señalar que la capacidad de control de glicemia postprandial reportada en los estudios antes mencionadas, pero no evidenciada en nuestra investigación, no se debe a alga propiamente tal, sino más bien a la disponibilidad de los compuestos que son capaces de producir dichas actividades inhibitorias, y que al probablemente, no se administraron de forma efectiva en nuestro extracto, posiblemente debido a la periodicidad de la administración de extracto, a la baja concentración de compuestos bioactivos alcanzados en el EAq a diferencia de otras investigaciones que utilizan compuestos purificados.

De manera adicional, el suero obtenido de los animales de experimentación, fue analizado con parámetros de estrés oxidativo como la determinación de sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico (TBARS), las que se relacionan directamente con la existencia de peroxidación lipídica mediante el metabolito secundario de la misma, malondialdehído. La data obtenida, no evidencia cambios de concentración de malonaldehído entre cada grupo experimental (N, NE, G y GE), por lo que no se puede identificar una protección a la peroxidación lipídica en suero debido a la presencia de EAq. Esto difiere de otras investigaciones, en que se ha utilizado extracto de florotaninos, como el dieckol y se ha documentado que, en presencia de dichos extractos, los niveles de peroxidación lipídica disminuyen. Desde esta perspectiva, estudios como el de Kang *et al.*, 2015 que se enfocó en el uso de extractos de la microalga *Phaeodactylum tricurnutum*, observaron un aumento de los TBARS en animales alimentados con dieta alta en grasa. Sin embargo, en presencia del extracto de microalga, se redujo con valores comparables al grupo control (con dieta normal, sin extracto), lo que implica que este extracto redujo la peroxidación lipídica asociada al consumo de una dieta alta en grasa. Del mismo modo, el estudio del año 2011, evidenció la inhibición de la actividad de peroxidación lipídica en células HT29 con inducción de estrés oxidativo con H₂O₂, por parte de florotaninos aislados como floroglucinol, eckol, trifloroethol A, eckstolonol y dieckol; siendo este último el con mayor actividad inhibitoria de peroxidación lipídica con un 58%, a una concentración de 50 uM. De forma complementaria, en otro de los estudios mencionados con anterioridad, se pudo evidenciar una reducción de los niveles de TBARS con una suplementación oral de extracto con 45.99% de polifenoles, dentro de los cuales el 10% correspondía a dieckol., lo que finalmente permite asociar a estos florotaninos de las algas como los principales antioxidantes presentes en las mismas y con mayores actividades biológicas.

En resumen, los resultados obtenidos en nuestra investigación no han sido concluyentes con respecto a la presencia de un extracto capaz de controlar de manera específica alteraciones asociadas al síndrome metabólico como es el caso de la hiperglicemia, y el aumento de peso sostenido con la exposición dieta de alto contenido

graso y calórico. A pesar de ello, se ha podido evidenciar una actividad antioxidante presente en el extracto de manera *in vitro*, y al mismo tiempo, se genera la necesidad de continuar trabajando con este extracto en ensayos que permitan dilucidar con mayor claridad la función antioxidante del mismo en otros tipos celulares, en repuesta a la data obtenida en otros tipos de algas marrones no presentes en nuestra cosa. Las fortalezas de esta investigación se basan principalmente, en la realización de ensayos tanto *in vitro* como *in vivo* para análisis citotóxico de un extracto de elaboración propia de un alga de alto interés nutraceútico como es el caso de *Durvillaea antarctica*, y presenta la innovación, de haber sido utilizado para la suplementación de animales de experimentación, contribuyendo a generar una dosis no dañina para estos en base al ajuste de dosis realizado conforme a la literatura existente y a los signos y síntomas presentados por los mismos animales. En este sentido, no existe otro trabajo de investigación que cuente con un análisis *in vivo* de extracto acuoso de un alga chilena, pues la mayoría de los trabajos, que si bien son nuevos, han sido realizados de una manera *in vitro*, lo que permite tener un mayor control sobre la experimentación, que en un ensayo de tipo *in vivo*, donde se realiza el estudio dentro de un organismo vivo completo. Así mismo, la dosis de extracto fue controlada pues su administración se realizó vía sonda orogástrica siempre con la misma cantidad de extracto, lo que difiere de otras investigaciones, en que se suplementó el alimento con extractos de diferentes tipos de algas, particularmente de florotaninos aislados, y se hacía de manera *ad libitum*, aunque se mantenía una concentración específica por 100 gramos de alimento, no era seguro que cada animal experimental recibiera la misma cantidad de extracto. El tiempo de estudio, fue lo adecuado de acuerdo a lo observado en otros trabajos similares, y fue razonable, aunque probablemente, una de las debilidades de esta investigación, fue la periodicidad en que se administraba EAq, pues no fue suficiente para generar los cambios esperados en los parámetros metabólicos medidos en la presente investigación. Por estos motivos, se puede esperar que en futuros ensayos, la suplementación con extracto se de forma más frecuente, tal vez durante toda la semana, como se ha visto en otros estudios mencionados con anterioridad, para poder identificar si realmente la cantidad de compuestos bioactivos, particularmente los polifenoles de este extracto, poseen las capacidades mencionadas y estudiadas para algas como *Ecklonia cava*, y al mismo tiempo, se pueda generar extractos que tenga aislado este contenido fenólico con el fin de comprobar su potencial antidiabético, antiadipogénico y antioxidante.

6.3 Efecto de infusión de *Durvillaea antarctica* sobre respuesta glicémica postprandial a carbohidratos

A raíz de la evidencia encontrada de manera *in vitro*, de la acción de extractos de *Durvillaea antarctica* que inhiben enzimas degradadoras de carbohidratos complejos, esta investigación se propuso observar la acción de una infusión de *Durvillaea antarctica* de bajo procesamiento sobre la glicemia postprandial de 14 adultos (10 mujeres y 4 hombres) de forma aguda, mediante un ensayo randomizado cruzado (randomized controlled crossover trial). La selección de los participantes y el diseño del estudio se asemeja a otros estudios que se han realizado para comprobar la acción sobre la glicemia postprandial de otras algas pardas como *Undaria pinnatifida* (Wakame y Mekabu), *Ascophyllum nodosum* y *Fucus vesiculosus*, las cuales han sido puestas a prueba a través de diferentes métodos de administración (comprimidos, alimento completo) a seres humanos. Para reducir el riesgo de efectos adversos en personas, nuestro ensayo administró una infusión de *D. antarctica* de bajo procesamiento solo sometida a molienda, sin extracción de sus componentes, la que fue preparada, sumergiendo una bolsa porosa (que contenía el alga molida) en un recipiente con 100 mL de agua corriente con 12 horas de reposo, y fue probada en todos los participantes de la investigación. En otras investigaciones, como la de Paradis *et al.*, 2011, se utilizó un extracto comercial en comprimidos, que es una mezcla de las algas *A. nodosum* y *F. vesiculosus* (250 mg, con 10% de polifenoles). Por su parte, en la investigación de Tanemura *et al.*, 2014., los participantes consumieron 70 gramos de *U. pinnatifida* (Wakame) o esporas de esta (Mekabu), como acompañamiento de un desayuno tradicional japonés que consiste en 200 gramos de arroz blanco, 50 gramos de porotos de soya cocidos, 60 gramos de papas y 40 gramos de brocoli, mientras que en el ensayo de Yoshinaga & Mitamura, 2019., utilizó 4 gramos de wakame como alimento en compañía de 200 gramos de arroz. El estudio de Murray *et al.* 2018, en tanto, utilizó un extracto de polifenoles obtenido de *F. vesiculosus*. Los estudios antes mencionados, y el nuestro, tienen en común identificar si las algas pardas son capaces de revertir el aumento de la glicemia postprandial tras una carga de carbohidratos (45 a 50 gramos de carbohidratos disponibles), a pesar de ser aplicados de formas distintas y con diferentes duraciones. Al igual que en el estudio de Murray, nuestro estudio evaluó con una dosis única de infusión su efecto agudo sobre el aumento de la glicemia postprandial tras una carga de carbohidratos (45 gramos de carbohidratos disponibles), sin embargo se debe mencionar que este último evaluó una dosis única de extracto de polifenoles, en forma de comprimidos y con 3 grupos experimentales (placebo, dosis baja y dosis alta de polifenoles), con una caracterización nutricional completa del extracto, mientras que la composición nutricional de nuestra infusión no fue caracterizada.

Los resultados obtenidos en la presente investigación indican que no hay diferencias significativas entre los valores de glicemia en ayunas entre los participantes, que en promedio fue de 104,9 mg/dL (post ayuno nocturno de 12 horas), que fue superior al promedio 78 mg/dL de glicemia en ayunas del grupo de Murray *et al.* Esto puede deberse a múltiples factores, tales como las diferencias entre el IMC promedio que, en nuestro estudio, bordea la obesidad (29,6 kg/m²) mientras que en la de Murray, los valores fueron de estado nutricional normal (21,9 kg/m²), lo cual puede incidir en un mayor nivel de glicemia en ayunas, dado que la obesidad es un factor

de riesgo para el desarrollo de la resistencia a la insulina, estadio inicial para el desarrollo de diabetes. En el estudio de Paradis et al., tampoco se observaron diferencias significativas en la glicemia en ayunas entre grupos de experimentación, y el IMC promedio fue de 24,9 kg/m², con un promedio de glicemia inicial 89,9 mg/dl, lo cual permite inferir que, a mayor IMC, mayor es el valor de la glicemia en ayunas.

Nuestro estudio se realizó en dos días distintos, ambos con toma de glicemia con ayuno nocturno (12 horas) a través de punción capilar y medición con glucómetro, lo cual correspondía al tiempo 0 de la curva. El primer día, los participantes ingirieron 100 mL de agua corriente y luego una carga de 45 gramos de carbohidratos en 100 gramos de pan blanco. Luego, se les realizó medición de glicemia a los 15, 30 y 45 minutos postcarga,. Al día siguiente, el procedimiento se repitió, pero se reemplazó el agua corriente, por la infusión de *D. antarctica*. En el caso de Murray et al., la experimentación se realizó en 3 condiciones diferentes, utilizando comprimidos placebo (sin polifenoles), de 500 mg (140 mg de polifenoles) y de 2000 mg (560 mg de polifenoles), los que se utilizaron de forma aleatoria para cada grupo. Tras el consumo de 50 gramos de carbohidratos disponibles (103 gramos de pan) se midió la glicemia de forma capilar postcarga a los 15, 30, 45, 60, 90 y 120 minutos. Los resultados de Murray et al., no tuvieron significancia con respecto a una reducción de la glicemia posprandial asociada a la suplementación con el extracto de polifenoles, por lo que, este componente no sería capaz de revertir el aumento de la glicemia. Los mismos resultados se replican en el uso de los comprimidos de las algas *A. nodosum* y *F. vesiculosus*, que a pesar de contener compuestos que actúan como inhibidores de enzimas que participan en la digestión de carbohidratos, no se observó diferencias significativas en la reducción de la glicemia post ingesta de 50 gramos de carbohidratos provenientes de pan. En el trabajo de Tanemura et al., se utilizó Wakame y Mekabu como alimento directo (70 gramos) formando parte de un tiempo de comida completo, en compañía de arroz blanco, porotos de soya, papas y brocoli. Las condiciones experimentales fueron 3, una control (sin algas), otra con Wakame y otra con Mekabu, arrojando como resultado una reducción significativa de las glicemias posprandiales en aquel grupo con ingesta de Mekabu por sobre el control, y aquel suplementado solo con Wakame, por lo cual el consumo del alimento en su totalidad si tuvo la capacidad de revertir el aumento de la glicemia. Al hacer la comparación con nuestros resultados, se evidencia que, en el caso de la infusión existe una tendencia a la baja de la glicemia postcarga, no obstante estas diferencias no fueron significativas al hacer comparaciones entre el día control y el día con infusión. Es importante mencionar que, al igual que Murray *et al.*, el grupo de Tanemura, tomo muestras sanguíneas a los 0, 30, 45, 60, 90, 120 y 180 minutos postprandiales a través de punción venosa. No obstante, los peaks de glicemia fueron alcanzados antes de los 30 minutos post consumo de alimentos, por lo que, a pesar de que nosotros no realizamos mediciones de glicemia hasta los 120 minutos, nuestro rango de tiempo abarca las variaciones glicémicas postprandiales más relevantes.

Conjuntamente, Yoshinaga y Mitamura et al., también evaluó el consumo directo de 4 gramos de Wakame (en este caso remojado) con arroz, y al igual que Tanemura, observaron una baja de glicemia a los 30 minutos postcarga, estadísticamente significativas, y con tendencia a la baja hasta los 120 minutos postcarga. Estos resultados, muestran que las intervenciones con formas menos procesadas de algas, mostraron mejores en cuanto al control de la glicemia postprandial, en comparación con intervenciones con extractos. Lo anterior

sugiere que los compuestos extraídos no son capaces de revertir el incremento de glicemia en forma aislada y requieren de otros componentes nutricionales presentes en el alga. Por lo tanto, nuestra infusión, al ser menos procesada y tratándose del uso del alga sin extracción de componentes, se puede esperar que usando mayor cantidad de cochayuyo molido para preparar la infusión, y aumentando la cantidad de participantes en el estudio, pueda registrarse mayores reducción de las glicemias postprandiales y eventualmente diferencias significativas. Los investigadores también compararon los resultados entre grupos experimentales, a través del análisis del área bajo la curva (ABC) obtenida de las muestras de glicemia postprandiales, y en este sentido, Murray *et al.*, obtuvieron una tendencia a la baja de este valor a través del tiempo, pero esta no tuvo significancia estadística. En el caso de Tanemura, la ABC fue significativamente menor en la etapa posprandial temprana (0-30 minutos) y con tendencia a la baja posterior en el grupo tratado con Mekabu, mientras que el tratado con Wakame, no tuvo diferencias significativas. En el caso de nuestro estudios también hubo una tendencia a la reducción de la ABC, lo que se traduce en una disminución de la respuesta glicémica de 20%, pero que tampoco fue estadísticamente significativo en relación con el ABC control.

Nuestra investigación, no evidenció resultados estadísticamente significativos en favor de la infusión utilizada, sin embargo, se debe destacar el hecho de que se observó una tendencia a la disminución de la glicemia postprandial, lo que sugiere que la infusión podría ser una alternativa no farmacológica para controlar las condiciones de aumento desmesurado de glicemia postcarga. Como proyecciones de esta investigación, se comentó la necesidad de aumentar la cantidad de cochayuyo usado para preparar la infusión, así como la cantidad de participantes del estudio para comprobar la efectividad de la infusión para el control de la glicémica postprandial. Además sería, dado que fue utilizado solo de forma aguda y en dosis única, es necesario estudiar su acción prolongada en el tiempo a través de la administración crónica. De igual modo, al desconocer su caracterización nutricional, no se puede atribuir los eventuales beneficios del consumo de esta infusión a un compuesto en particular. Posiblemente, la presencia de florotaninos en extractos de *D. antartica* (Pacheco *et al.*) podrían ser responsables del mejoramiento del control glicémico, sin embargo también se puede especular que la fibra soluble presente en la infusión, que fue observable de forma por la viscosidad de la infusión, tendría implicancia en la reducción de la glicemia posprandial. Esta posibilidad también es considerada en otras investigaciones, señalando que a la fibra soluble presente en las algas (*U. pinnatifida*, por ejemplo) como parte importante de la tendencia a la baja de la glicemia poscarga, por su capacidad de enlentecimiento del vaciamiento gástrico, lo que limitaría la tasa de absorción de glucosa por parte del intestino. Estudios futuros, podrían abarcar el uso de la infusión, ya caracterizada nutricionalmente para saber a qué compuestos atribuir la bioactividad de control glicémico, además de, realizar mediciones de otros parámetros metabólicos como la insulinemia, HOMA_{IR}, para estudiar el efecto de la infusión sobre la sensibilidad a la insulina.

7. Conclusiones

Los resultados de la presente investigación permiten establecer las siguientes conclusiones:

- Los preadipocitos 3T3-L1 en cultivo no sufren efectos citotóxicos cuando son expuestos a altas concentraciones de extracto acuoso de *Durvillaea antarctica*, incluyendo 40 mg/dL por hasta 24 horas.
- El extracto acuoso de *Durvillaea antarctica* provoca una disminución de la tasa de proliferación celular de preadipocitos 3T3-L1, alcanzando una reducción del 60% ante una dosis de 20 mg/dL.
- El peróxido de hidrógeno provoca estrés oxidativo y muerte celular de preadipocitos 3T3-L1, alcanzando una reducción al 20% en la viabilidad con una exposición a 0,1 mM de peróxido de hidrógeno.
- El extracto acuoso de *Durvillaea antarctica* protege a los preadipocitos 3T3-L1 frente al estrés oxidativo inducido por peróxido, recuperando la actividad de la cadena respiratoria mitocondrial y la integridad de la lisosomal.
- El consumo crónico por 10 meses de una dieta alta en grasa provoca aumento de tejido graso blanco, intolerancia a la glucosa, aumento de colesterol total y un aumento de peso leve en ratones BALB/c machos adultos.
- La administración de 66 mg/kg de peso de extracto acuoso de *Durvillaea antarctica* dos veces por semana vía orogástrica a ratones BALB/c adultos, no logra revertir las alteraciones metabólicas causadas por el consumo crónico de una dieta alta en grasa.
- El consumo de una infusión de cochayuyo previo a la ingesta de carbohidratos complejos tiende a causar una disminución (no estadísticamente significativa) de la respuesta glicémica postprandial en voluntarios adultos, la cual fue heterogénea entre los distintos individuos.

8. Referencias Bibliográficas

1. Martínez-Sanguinetti, MA., Petermann-Rocha, F., Villagrán, M., Ulloa, N., Nazar, G., Troncoso-Pantoja, C., Garrido-Méndez, A., Mardones, L., Lanuza, F., Leiva, AM., Lasserre-Laso, N., Martorell, M., Celis-Morales, C.(2020). Desde una mirada global al contexto chileno: ¿Qué factores han repercutido en el desarrollo de obesidad en Chile? (Parte 2). *Revista chilena de nutrición*, 47(2), 307-316.
2. Subsecretaría de Salud Pública. División de Planificación Sanitaria. Departamento de Epidemiología (2017). Tercera Encuesta Nacional de Salud (ENS) 2016-2017.
3. Baeza, M., Cuadrado, A. (2021). Evolución de la cobertura efectiva de diabetes mellitus tipo 2 en Chile: una mirada a las encuestas poblacionales y datos administrativos. *Medwave*, 21. <https://doi.org/10.5867/medwave.2021.s2.sp16>
4. Organización Panamericana de la Salud (OPS) / Organización Mundial de la Salud (OMS) (2021) Enfermedades no transmisibles. <https://www.paho.org/es/temas/enfermedades-no-transmisibles>
5. Organización Mundial de la Salud (OMS).(2020). Alimentación sana. <https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/healthy-diet>
6. Freitas, M. V., Pacheco, D., Cotas, J., Mouga, T., Afonso, C., & Pereira, L. (2021). Red Seaweed Pigments from a Biotechnological Perspective. *Phycology*, 2(1), 1–29. MDPI AG. Retrieved from <http://dx.doi.org/10.3390/phycolgy2010001>
7. Figueroa, V., Farfán, M., & Aguilera, JM (2021) Seaweeds as Novel Foods and Source of Culinary Flavors, *Food Reviews International*, DOI: 10.1080/87559129.2021.1892749
8. Bellorín Romero, A. (2022). Algas: una introducción a la ficología. 1. RIL editores. <https://elibro-net.dti.sibucsc.cl/es/ereader/sibucsc/226464?page=1>
9. Quitral, V., Jofré, M. J., Rojas, N., Romero, N., & Valdés, I. (2019). Algas marinas como ingrediente funcional en productos cárnicos. *Revista chilena de nutrición*, 46(2), 181-189.
10. Tala, F. (Ed. Álvarez, G. y Uribe, E.) (2017). Sobre las Algas. *Comiendo Algas: Recetas de Cocina*. Primera Edición. Coquimbo; p. 11-25
11. Montecino, S., Cornejo, A., Razeto, J (2012). Patrimonio Alimentario de Chile: productos y preparaciones de la Región de Valparaíso. Primera Edición: p. 233- 239.
12. Dillehay, T. D., Ramirez, C., Pino, M., Collins, M. B., Rossen, J., & Pino-Navarro, J. D. (2008). Monte Verde: Seaweed, Food, Medicine, and the Peopling of South America. *Science*, 320(5877), 784–786. doi:10.1126/science.1156533
13. FIA 2016. Patrimonio Alimentario de Chile. Productos y Preparaciones de la Región del Biobío. Santiago, Chile
14. FAO(2018).The global status of seaweed production, trade and utilization Globefish Research Programme, (124).

15. Bonanno, G. & Orlando-Bonaca, M. (2018). Chemical elements in Mediterranean macroalgae. A review. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 148, 44-71. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2017.10.013>
16. REAL ACADEMIA ESPAÑOLA: Diccionario de la lengua española, 23.ª ed., [versión 23.5 en línea]. <<https://dle.rae.es>> [10 de diciembre, 2022].
17. Sernapesca. (2021). Anuario Estadístico de Pesca. Servicio Nacional de Pesca.
18. Universidad Arturo Prat (2014). INFORME FINAL: Incorporación de la Industria Alimentaria de Consumo Humano Directo como Fuente de Agregación de Valor para las Macroalgas Nacionales. <https://www.opia.cl/601/w3-article-100615.html>
19. Macaya-Horta, E. (2022)¿Qué son y cómo se clasifican las algas? Museo de Historia Natural de Concepción. <https://www.mhnconcepcion.gob.cl/noticias/que-son-y-como-se-clasifican-las-algas>
20. Fraser, C. I., Velásquez, M., Nelson, W. A., Macaya, E. C., & Hay, C. (2019). The biogeographic importance of buoyancy in macroalgae: a case study of the southern bull-kelp genus *Durvillaea* (Phaeophyceae), including descriptions of two new species. 1. *Journal of Phycology*. doi:10.1111/jpy.12939
21. Pinto, C., Ibáñez, M. R., Loyola, G., León, L., Salvatore, Y., González, C., Barraza, V., et al. (2021). Characterization of an Agarophyton chilense Oleoresin Containing PPAR γ Natural Ligands with Insulin-Sensitizing Effects in a C57Bl/6J Mouse Model of Diet-Induced Obesity and Antioxidant Activity in *Caenorhabditis elegans*. *Nutrients*, 13(6), 1828. MDPI AG. Retrieved from <http://dx.doi.org/10.3390/nu13061828>
22. Figueroa, V., Bunger, A., Ortiz, J., Aguilera, JM.(2022). Sensory descriptors for three edible Chilean seaweeds and their relations to umami components and instrumental texture. *J Appl Phycol* (34); 3141–3156
23. SUBPESCA (2021). Nuevo estudio: chilenos consumen anualmente casi 15 kilos de productos del mar. (2021, 12 abril). SUBPESCA Difusión. <https://www.subpesca.cl/portal/617/w3-article-110587.html>
24. Zava, T. T., & Zava, D. T. (2011). Assessment of Japanese iodine intake based on seaweed consumption in Japan: A literature-based analysis. *Thyroid research*, 4, 14.
25. Murai, U., Yamagishi, K., Sata, M., Kokubo, Y., Saito, I., Yatsuya, H., Ishihara, J., Inoue, M., Sawada, N., Iso, H. & Tsugane, S. (2019). Seaweed intake and risk of cardiovascular disease: the Japan Public Health Center–based Prospective (JPHC) Study. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 110(6), 1449-1455. <https://doi.org/10.1093/ajcn/nqz231>
26. Chichibu, H., Yamagishi, K., Kishida, R., Maruyama, K., Hayama-Terada, M., Shimizu, Y., Muraki, I., Umesawa, M., Cui, R., Imano, H., Ohira, T., Tanigawa, T., Sankai, T., Okada, T., Kitamura, A., Kiyama, M., & Iso, H. (2021). Seaweed Intake and Risk of Cardiovascular Disease: The Circulatory Risk in Communities Study (CIRCS). *Journal of Atherosclerosis and Thrombosis*, 28(12), 1298-1306. <https://doi.org/10.5551/jat.61390>

27. Kishida, R., Yamagishi, K., Muraki, I., Sata, M., Tamakoshi, A., & Iso, H. (2020). Frequency of Seaweed Intake and Its Association with Cardiovascular Disease Mortality: The JACC Study. *Journal of Atherosclerosis and Thrombosis*, 27(12), 1340-1347. <https://doi.org/10.5551/jat.53447>
28. Murai, U., Yamagishi, K., Kishida, R., & Iso, H. (2020). Impact of seaweed intake on health. *European Journal of Clinical Nutrition*, 75(6), 877–889. doi:10.1038/s41430-020-00739-8
29. OECD (2019), *Health at a Glance 2019: OECD Indicators*, OECD Publishing, París. <http://doi.org/10.1787/4dd50c09-en>.
30. Véliz, K., Toledo, P., Araya, M., Gómez, M. F., Villalobos, V. & Tala, F. (2023). Chemical composition and heavy metal content of Chilean seaweeds: Potential applications of seaweed meal as food and feed ingredients. *Food Chemistry*, 398, 133866. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2022.133866>
31. Peñalver, R., Lorenzo, J. M., Ros, G., Amarowicz, R., Pateiro, M., & Nieto, G. (2020). Seaweeds as a Functional Ingredient for a Healthy Diet. *Marine Drugs*, 18(6), 301. MDPI AG.
32. Stadnichuk, I. N. & Tropin, I. V. (2017). Phycobiliproteins: Structure, functions and biotechnological applications. *Applied Biochemistry and Microbiology*, 53(1), 1-10. <https://doi.org/10.1134/s0003683817010185>
33. Díaz-Domínguez, G., Marsán Suárez, V. & del Valle Pérez, L. (2016). Principales propiedades inmunomoduladoras y antiinflamatorias de la ficobiliproteína C-ficocianina. *Revista Cubana de Hematología, Inmunología y Hemoterapia*, 32(4), 447-454.
34. Tello-Ireland, C., Lemus-Mondaca, R., Vega-Gálvez, A., López, J. & Di Scala, K. (2011). Influence of hot-air temperature on drying kinetics, functional properties, colour, phycobiliproteins, antioxidant capacity, texture and agar yield of alga *Gracilaria chilensis*. *LWT - Food Science and Technology*, 44(10), 2112-2118. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2011.06.008>
35. Matos, Â. P. (2019). Microalgae as a Potential Source of Proteins. *Proteins: Sustainable Source, Processing and Applications*, 63–96. doi:10.1016/b978-0-12-816695-6.00003-9
36. Demarco, M., Oliveira de Moraes, J., Matos, N. P., Derner, R. B., de Farias Neves, F. & Tribuzi, G. (2022). Digestibility, bioaccessibility and bioactivity of compounds from algae. *Trends in Food Science & Technology*, 121, 114-128. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2022.02.004>
37. Wells, M. L., Potin, P., Craigie, J. S., Raven, J. A., Merchant, S. S., Helliwell, K. E., Smith, A. G., Camire, M. E. & Brawley, S. H. (2016). Algae as nutritional and functional food sources: revisiting our understanding. *Journal of Applied Phycology*, 29(2), 949-982. <https://doi.org/10.1007/s10811-016-0974-5>
38. Mateluna, C., Figueroa, V., Ortiz, J. & Aguilera, J. (2020). Effect of processing on texture and microstructure of the seaweed *Durvillaea antarctica*. *Journal of Applied Phycology*, 32(6), 4211-4219. <https://doi.org/10.1007/s10811-020-02259-1>
39. Tiwari, B. K., & Troy, D. (Eds.). (2015). *Seaweed sustainability : Food and non-food applications*. Elsevier Science & Technology.

40. Ortiz, J., Romero, N., Robert, P., Araya, J., Lopez-Hernández, J., Bozzo, C., Navarrete, E., Osorio, A. & Rios, A. (2006). Dietary fiber, amino acid, fatty acid and tocopherol contents of the edible seaweeds *Ulva lactuca* and *Durvillaea antarctica*. *Food Chemistry*, 99(1), 98-104. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2005.07.027>
41. Dominguez, H. (Ed.). (2013). *Functional ingredients from algae for foods and nutraceuticals*. Elsevier Science & Technology.
42. Pérez Lloréns, J. & Hernández Carrero, I. (2016). *Las algas se comen: un periplo por la biología, la historia, las curiosidades y la gastronomía..* Servicio de Publicaciones de la Universidad de Cádiz. <https://elibro-net.dti.sibucsc.cl/es/ereader/sibucsc/103007?page=123>
43. Ibáñez, E. (2017). *Las algas que comemos..* Editorial CSIC Consejo Superior de Investigaciones Científicas. <https://elibro-net.dti.sibucsc.cl/es/ereader/sibucsc/41876?page=1>
44. Simopoulos, A. P. (2008). The Importance of the Omega-6/Omega-3 Fatty Acid Ratio in Cardiovascular Disease and Other Chronic Diseases. *Experimental Biology and Medicine*, 233(6), 674-688. <https://doi.org/10.3181/0711-mr-311>
45. Gutiérrez Cuesta, R., González García, K. L., Valdés Iglesias, O. D. R., Hernández Rivera, Y. & Acosta Suárez, Y. (2016). Algas marinas como fuente de compuestos bioactivos en beneficio de la salud humana: Artículo de Revisión/ Seaweeds as sources of bioactive compounds in the benefit of human health: A Review. *Biocencia*, 18(3), 20-27. <https://doi.org/10.18633/biocencia.v18i3.331>
46. Cardoso, S., Pereira, O., Seca, A., Pinto, D., & Silva, A. (2015). Seaweeds as Preventive Agents for Cardiovascular Diseases: From Nutrients to Functional Foods. *Marine Drugs*, 13(11), 6838–6865. MDPI AG. Retrieved from <http://dx.doi.org/10.3390/md13116838>
47. Milinovic, J., Rodrigues, C., Diniz, M., & Noronha, J. P. (2021). Determination of total iodine content in edible seaweeds: Application of inductively coupled plasma-atomic emission spectroscopy. *Algal Research*, 53, 102149. doi:10.1016/j.algal.2020.102149
48. Lozano Muñoz, I., & Díaz, N. F. (2020). Minerals in edible seaweed: health benefits and food safety issues. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 1–16. doi:10.1080/10408398.2020.1844637
49. Astorga-España, M. S. & Mansilla, A. (2013). Sub-Antarctic macroalgae: opportunities for gastronomic tourism and local fisheries in the Region of Magallanes and Chilean Antarctic Territory. *Journal of Applied Phycology*, 26(2), 973-978. <https://doi.org/10.1007/s10811-013-0141-1>
50. Uribe, E., Pardo-Orellana, C. M., Vega-Gálvez, A., Ah-Hen, K. S., Pastén, A., García, V., & Aubourg, S. P. (2019). Effect of drying methods on bioactive compounds, nutritional, antioxidant, and antidiabetic potential of brown alga *Durvillaea antarctica*. *Drying Technology*, 38(14), 1915-1928. <https://doi.org/10.1080/07373937.2019.1679830>
51. Linus Pauling Institute (2023). Vitamin C. <https://lpi.oregonstate.edu/es/mic/itaminas/vitamina-C>
52. Lomartire, S., & Gonçalves, A. M. M. (2022). An Overview of Potential Seaweed-Derived Bioactive Compounds for Pharmaceutical Applications. *Marine Drugs*, 20(2), 141. <https://doi.org/10.3390/md20020141>

53. Burgos-Díaz, C., Opazo-Navarrete, M., Palacios, J. L., Verdugo, L., Anguita-Barrales, F., & Bustamante, M. (2022). Food-grade bioactive ingredient obtained from the *Durvillaea incurvata* brown seaweed: Antibacterial activity and antioxidant activity. *Algal Research*, 68, 102880. <https://doi.org/10.1016/j.algal.2022.102880>
54. Okeke, E. S., Nweze, E. J., Chibuogwu, C. C., Anaduaka, E. G., Chukwudozie, K. I., & Ezeorba, T. P. C. (2021). Aquatic Phlorotannins and Human Health: Bioavailability, Toxicity, and Future Prospects. *Natural Product Communications*, 16(12), 1934578X2110561. <https://doi.org/10.1177/1934578x211056144>
55. Erpel, F., Mateos, R., Perez-Jimenez, J., & Perez-Correa, J. R. (2020). Phlorotannins: From isolation and structural characterization, to the evaluation of their antidiabetic and anticancer potential. *Food Res Int*, 137, 109589. doi:10.1016/j.foodres.2020.109589
56. Khan, F., Jeong, G. J., Khan, M. S. A., Tabassum, N., & Kim, Y. M. (2022). Seaweed-Derived Phlorotannins: A Review of Multiple Biological Roles and Action Mechanisms. *Marine Drugs*, 20(6), 384. <https://doi.org/10.3390/md20060384>
57. Murugan, A. C., Karim, M. R., Yusoff, M. B. M., Tan, S. H., Asras, M. F. B. F., & Rashid, S. S. (2015). New insights into seaweed polyphenols on glucose homeostasis. *Pharmaceutical Biology*, 53(8), 1087–1097. doi:10.3109/13880209.2014.959615
58. Kawamura-Konishi Y., Watanabe N., Saito M., Nakajima N., Sakaki T., Katayama T., Enomoto T. (2012) Isolation of a new phlorotannin, a potent inhibitor of carbohydrate-hydrolyzing enzymes, from the brown alga *Sargassum patens*. *J. Agric. Food Chem.* 60:5565–5570. doi: 10.1021/jf300165j
59. Roy M.-C., Anguenot R., Fillion C., Beaulieu M., Bérubé J. & Richard D.(2011). Effect of a commercially-available algal phlorotannins extract on digestive enzymes and carbohydrate absorption in vivo. *Food Research International* 44: 3026–3029.
60. Singh, I. P., & Sidana, J. (2013). Phlorotannins en Dominguez, H. (Ed.), *Functional Ingredients from Algae for Foods and Nutraceuticals* (pp. 81–204). Woodhead Publishing
61. Heo SJ, Ko SC, Cha SH, Kang DH, Park HS, Choi YU, Kim D, Jung WK, Jeon YJ.(2009). Effect of phlorotannins isolated from *Ecklonia cava* on melanogenesis and their protective effect against photo-oxidative stress induced by UV-B radiation. *Toxicol In Vitro*. 23:1123–1130.
62. Lee SH, Han JS, Heo SJ, Hwang JY, Jeon YJ.(2010) Protective effects of dieckol isolated from *Ecklonia cava* against high glucose-induced oxidative stress in human umbilical vein endothelial cells. *Toxicol In Vitro*. 24:375–381.
63. Li Y, Qian ZJ, Ryu B, Lee SH, Kim MM, Kim SK.(2009) Chemical components and its antioxidant properties in vitro: An edible marine brown alga, *Ecklonia cava*. *Bioorg Med Chem*.17:1963–1973.
64. Kang KA, Lee KH, Chae S, Zhang R, Jung MS, Lee Y, Kim SY, Kim HS, Joo HG, Park JW, Ham YM, Lee NH, Hyun JW.(2005). Eckol isolated from *Ecklonia cava* attenuates oxidative stress induced cell damage in lung fibroblast cells. *FEBS Lett*. 579:6295–6304.
65. Lee, H. A., Lee, J. H., & Han, J. S. (2017). A phlorotannin constituent of *Ecklonia cava* alleviates postprandial hyperglycemia in diabetic mice. *Pharmaceutical Biology*, 55 (1), 1149–1154

66. Moon, H. E., Islam, M. N., Ahn, B. R., Chowdhury, S. S., Sohn, H. S., Jung, H. A., et al. (2011). Protein tyrosine phosphatase 1B and α -glucosidase inhibitory phlorotannins from edible brown algae, *Ecklonia stolonifera* and *Eisenia bicyclis*. *Bioscience Biotechnology and Biochemistry*, 75(8), 1472–1480.
67. Wijesekara I, Yoon NY, Kim SK. (2010). Phlorotannins from *Ecklonia cava* (Phaeophyceae): Biological activities and potential health benefits. *Biofactors* 36:408–14.
68. Lee, S. H., Min, K. H., Han, J. S., Lee, D. H., Park, D. B., Jung, W. K. & Jeon, Y. J. (2012). Effects of brown alga, *Ecklonia cava* on glucose and lipid metabolism in C57BL/KsJ-db/db mice, a model of type 2 diabetes mellitus. *Food Chem Toxicol*, 50(3-4), 575-582.
69. Sharifuddin, Y., Chin, Y.-X., Lim, P.-E., & Phang, S.-M. (2015). Potential Bioactive Compounds from Seaweed for Diabetes Management. *Marine Drugs*, 13(8), 5447–5491.
70. Lee, S. H., Karadeniz, F., Kim, M. M., & Kim, S. K. (2009). α -Glucosidase and α -amylase inhibitory activities of phloroglucinal derivatives from edible marine brown alga, *Ecklonia cava*. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 89(9), 1552–1558.
71. Lee, S.H., Park, M.-H., Heo, S.-J., Kang, S.-M., Ko, S.-C., Han, J.-S., & Jeon, Y.-J. (2010). Dieckol isolated from *Ecklonia cava* inhibits α -glucosidase and α -amylase in vitro and alleviates postprandial hyperglycemia in streptozotocin-induced diabetic mice. *Food and Chemical Toxicology*, 48(10), 2633–2637. doi: 10.1016/j.fct.2010.06.032
72. Wijesinghe WA, Ko SC, Jeon YJ. Effect of phlorotannins isolated from *Ecklonia cava* on angiotensin I-converting enzyme (ACE) inhibitory activity. *Nutr Res Pract*. 2011 Apr;5(2):93-100. doi: 10.4162/nrp.2011.5.2.93. Epub 2011 Apr 23. PMID: 21556221; PMCID: PMC3085808
73. Ko, S. C., Lee, M., Lee, J. H., Lee, S. H., Lim, Y., & Jeon, Y. J. (2013). Dieckol, a phlorotannin isolated from a brown seaweed, *Ecklonia cava*, inhibits adipogenesis through AMP-activated protein kinase (AMPK) activation in 3T3-L1 preadipocytes. *Environmental toxicology and pharmacology*, 36(3), 1253–1260. <https://doi.org/10.1016/j.etap.2013.10.011>
74. Kong, C.-S., Kim, J.-A., Ahn, B.-N., Vo, T. S. et al (2010). 1-(3, 5 - dihydroxyphenoxy)-7-(2, 4, 6-trihydroxyphenoxy)-2, 4, 9- trihydroxydibenzo-1, 4-dioxin inhibits adipocyte differentiation of 3T3-L1 fibroblasts. *Marine Biotechnol*. 12, 299– 307
75. Choi HS, Jeon HJ, Lee OH, Lee BY(2015). Dieckol, a major phlorotannin in *Ecklonia cava*, suppresses lipid accumulation in the adipocytes of high-fat diet-fed zebrafish and mice: Inhibition of early adipogenesis via cell-cycle arrest and AMPK α activation. *Mol Nutr Food Res*. 59(8):1458-71.
76. Pacheco, L. V., Parada, J., Perez-Correa, J. R., Mariotti-Celis, M. S., Erpel, F., Zambrano, A., & Palacios, M. (2020). Bioactive Polyphenols from Southern Chile Seaweed as Inhibitors of Enzymes for Starch Digestion. *Mar Drugs*, 18(7).
77. Kong, C.-S., Kim, J.-A., Ahn, B.-N., Vo, T. S. et al (2010). 1-(3, 5 - dihydroxyphenoxy)-7-(2, 4, 6-trihydroxyphenoxy)-2, 4, 9- trihydroxydibenzo-1, 4-dioxin inhibits adipocyte differentiation of 3T3-L1 fibroblasts. *Marine Biotechnol*. 12, 299– 307
78. Danneman, P. J., Suckow, M. A., & Brayton, C. (2000). *The Laboratory Mouse*. Taylor & Francis.

79. Silva-Santana, G., Bax, J. C., Fernandes, D. C. S., Bacellar, D. T. L., Hooper, C., Dias, A. A. S. O., Silva, C. B., Souza, A. M., Ramos, S., Santos, R. A., Pinto, T. R., Ramão, M. A., & Mattos-Guaraldi, A. L. (2020). Clinical hematological and biochemical parameters in Swiss, BALB/c, C57BL/6 and B6D2F1Mus musculus. *Animal Models and Experimental Medicine*, 3(4), 304-315. <https://doi.org/10.1002/ame2.12139>
80. Kang, S. M., Cha, S. H., Ko, J. Y., Kang, M. C., Kim, D., Heo, S. J., Kim, J. S., Heu, M. S., Kim, Y. T., Jung, W. K. & Jeon, Y. J. (2012). Neuroprotective effects of phlorotannins isolated from a brown alga, *Ecklonia cava*, against H₂O₂-induced oxidative stress in murine hippocampal HT22 cells. *Environmental Toxicology and Pharmacology*, 34(1), 96-105. <https://doi.org/10.1016/j.etap.2012.03.006>
81. Kang, H. S., Chung, H. Y., Kim, J. Y., Son, B. W., Jung, H. A. & Choi, J. S. (2004). Inhibitory phlorotannins from the edible brown alga *Ecklonia stolonifera* on total reactive oxygen species (ROS) generation. *Archives of Pharmacal Research*, 27(2), 194-198. <https://doi.org/10.1007/bf02980106>
82. Heo, S., Park, E., Lee, K. & Jeom, Y. (2005). Antioxidant activities of enzymatic extracts from brown seaweeds. *Bioresource Technology*, 96(14), 1613-1623. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2004.07.013>
83. Shih, M. K., Hou, C. Y., Dong, C. D., Patel, A. K., Tsai, Y. H., Lin, M. C., Xu, Z. Y., Perumal, P. K., Kuo, C. H., & Huang, C. Y. (2022). Production and Characterization of *Durvillaea antarctica* Enzyme Extract for Antioxidant and Anti-Metabolic Syndrome Effects. *Catalysts*, 12(10), 1284. <https://doi.org/10.3390/catal12101284>
84. Kang, M. J., Kim, S. M., Jeong, S. M., Choi, H. N., Jang, Y. H., & Kim, J. I. (2013). Antioxidant effect of *Phaeodactylum tricornutum* in mice fed high-fat diet. *Food Science and Biotechnology*, 22(1), 107-113. <https://doi.org/10.1007/s10068-013-0015-y>
85. Kang, M. C., Wijesinghe, W., Lee, S. H., Kang, S. M., Ko, S. C., Yang, X., Kang, N., Jeon, B. T., Kim, J., Lee, D. H., & Jeon, Y. J. (2013b). Dieckol isolated from brown seaweed *Ecklonia cava* attenuates type II diabetes in db/db mouse model. *Food and Chemical Toxicology*, 53, 294-298. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2012.12.012>
86. Paradis, M.E., Couture, P. & Lamarche, B (2011). A randomised crossover placebo-controlled trial investigating the effect of Brown seaweed (*Ascophyllum nodosum* and *Fucus vesiculosus*) on postchallenge plasma glucosa and insulin levels in men and women. *Appl. Physiol. Nutr. Met.* 36:913-919. Doi:10.1139/H11-115
87. Tanemura Y., Yamanaka-Okumura, H., Sakuma, M., Nii, Y., Taketani, Y & Takeda, E (2014). Effects of the intake of *Undaria pinnatifida* (Wakame) and its sporophylls (Mekabu) on postprandial glucosa and insulin metabolism. *J. Med. Invest.* 61: 291-297.
88. Yoshinaga, K & Mitamura, R (2019). Effects of *Undaria pinnatifida* (Wakame) on postprandial glycemia and insulin leveles in humans: a Randomized Crossover Trial. *Plant Foods Hum Nutr* . <https://doi.org/10.1007/s11130-019-00763-5>

89. Murray, M., Dordevic, A.L, Ryan, L. & Bonham, M.P (2018). The impact of a single dose of polyphenol-rich seaweed extract on postprandial glycaemic control in healthy adults: a Randomised Cross-Over Trial. *Nutrients*. 10:270. Doi:10.3390/nu10030270

Anexo



CONSENTIMIENTO INFORMADO

Estimado participante:

Mediante el presente documento, queremos invitarle a participar de la investigación **“Efecto agudo y crónico del consumo de infusión de cochayuyo sobre el estado nutricional y metabolismo glucídico”**, cuyo Investigador Responsable es **Carolina Aguirre Céspedes, RUT: 8.266.339-8 (caguirre@ucsc.cl)**, académico de la Facultad de Ciencias de la Universidad Católica de la Santísima Concepción. El presente documento tiene como finalidad dar a conocer los detalles del estudio y solicitar su consentimiento informado para participar en él.

1. Objetivo de la Investigación

El objetivo de la investigación es evaluar el efecto agudo y crónico del consumo de una infusión de Cochayuyo sobre variables antropométricas en adultos, incluyendo: peso corporal, perímetro de cintura, perímetro de cadera, masa grasa y masa libre de grasa; así como otras variables como glicemia y presión arterial.

2. Breve descripción del proyecto

El proyecto busca investigar el efecto del consumo de una infusión de cochayuyo sobre cambios en la composición corporal y sobre el metabolismo glucídico en pacientes con sobrepeso y/o obesidad. El uso medicinal de una infusión de cochayuyo es una costumbre tradicional empleada por las comunidades costeras con las cuales nos vinculamos a través del Programa de Recursos Naturales del Núcleo Científico Tecnológico para el Desarrollo Costero Sustentable de la Universidad Católica de la Santísima Concepción. Sin embargo, no existen estudios publicados que hayan evaluado el efecto de la infusión sobre el sobrepeso. Por otro lado, resultados preliminares obtenidos en nuestro laboratorio indicarían que el cochayuyo contiene compuestos que inhiben la acción de alfa amilasas, enzimas intestinales que degradan polisacáridos y por lo tanto, están involucradas en su absorción intestinal, provocando una disminución de glucosa en la sangre. En consecuencia, postulamos que el

Programa de Recursos Naturales para la Sustentabilidad
Núcleo Científico Tecnológico para el Desarrollo Costero Sustentable, UCSC
Alonso de Ribera 2850 - Concepción - Chile
Teléfono 412345260

consumo del extracto acuoso de cochayuyo previo al consumo de alimentos podría disminuir la respuesta glicémica a alimentos ricos en carbohidratos, efecto que podría contribuir a la prevención de alteraciones precursoras de la diabetes mellitus tipo 2, como la intolerancia a la glucosa.

El equipo de trabajo está conformado por :

- Msc. Mauricio Sotomayor, Nutricionista. Académico de la Facultad de Medicina de la UCSC
- Dr. Marcelo Villagrán, Bioquímico. Académico de la Facultad de Medicina de la UCSC
- Dra. Carolina Aguirre, Químico. Académico de la Facultad de Ciencias de la UCSC.
- Gabriela Basáez Aguirre. Estudiante de Enfermería de 5to año de la Universidad San Sebastián.

Se cuenta con el apoyo de personal administrativo del Programa de Recursos Naturales, Srta. Ruby Riveros y Seiji Machino.

3. Metodología

Se considera el estudio de personas adultas y/o adultos mayores (rango 20 años a 70 años) en estado nutricional normal, sobrepeso u obeso; que no presenten enfermedades renales ni hipertiroidismo. El estudio contempla los siguientes procedimientos (se adjunta esquema explicativo)

I) Medición del efecto agudo de la infusión de cochayuyo (IC):

Se determinará la respuesta glicémica a 100 g de pan blanco previa ingesta de 100 mL de IC o 100 mL de agua en dos días consecutivos en ayunas. En cada día de medición de la respuesta glicémica, se realizará el siguiente procedimiento:

- Medir la glicemia basal (tiempo 0) en una gota de sangre capilar mediante glucómetro, después de un periodo de ayuna de 10 a 12 h.
- Beber 100 mL de agua e inmediatamente después, ingerir 100 g de pan blanco.
- Medir la glicemia a los 15, 30, 45 y 60 minutos luego de haber ingerido el pan.

El mismo procedimiento anterior se repite el siguiente día, pero bebiendo 100 mL de IC en vez de 100 mL de agua. La IC será preparada vertiendo 100 mL de agua recién hervida sobre un sachet que contiene cochayuyo deshidratado, dejándolo reposar toda la noche.

II) Medición del efecto crónico de la infusión de cochayuyo (IC):

Los participantes del estudio beberán en ayunas, 100 ml de IC durante un periodo de 28 días seguidos. Luego de la ingesta de IC, los participantes podrán realizar sus actividades cotidianas habituales, sin restricciones derivadas del estudio.

Durante el periodo de ingesta de IC, los participantes se someterán a un conjunto de mediciones a realizarse una vez por semana en los días 1, 7, 14, 21 y 28 (contados a contar del día en que se comienza la intervención con IC). Las mediciones que se realizarán en forma semanal serán: peso corporal, porcentaje de masa grasa, perímetro de cintura, perímetro de cadera, glicemia con glucómetro, arteriograma y presión arterial. En el día de realización de las mediciones, un miembro del equipo de investigación concurrirá al domicilio del participante y realizará las mediciones, para lo cual utilizará los elementos de protección personal y medidas adecuadas para prevenir contagio de COVID19. Las mediciones se realizarán en un momento del plan paso a paso que permita movilidad (fase 2 o superior).

4. Su participación en el estudio

Su participación consistirá en preparar la IC e ingerirla diariamente en ayunas durante 1 mes. Una vez por semana deberá estar disponible para realizar las mediciones en un periodo máximo de 1 hora, en horario a convenir con el equipo de investigación.

Para la medición del efecto agudo de la IC sobre la respuesta glicémica al pan, deberá realizar las mediciones de glicemia en su domicilio en forma autónoma, siguiendo las instrucciones preparadas en un video y **bajo la supervisión de un miembro del equipo de investigación en el primer día de medición**. Los valores de glicemia deberán ser registrados en una planilla personal.

Su participación en este estudio es de carácter libre y voluntario, pudiendo dar por finalizada su participación en cualquier momento de la realización del estudio, incluso con posterioridad a la realización de las mediciones en el caso que requiera que sus datos no sean considerados en esta investigación. La finalización de la participación en el estudio no requerirá justificación previa.

Si usted participa en esta investigación lo hace bajo su expreso consentimiento informado que firma y autoriza.

5. Confidencialidad

Toda la información que se genere a partir del presente estudio será tratada confidencialmente. Actuará en calidad de custodio de los datos la Investigadora Responsable, Dra. Carolina Aguirre. Al respecto, su nombre no aparecerá en el trabajo final, ni en los informes parciales o en la difusión académica de los resultados, ya que para el análisis de los datos, la identidad de los participantes estará codificada, evitando cualquier filtración voluntaria o involuntaria de los datos asociados a cada persona.

6. Beneficios

El mayor beneficio de este trabajo investigativo es que los resultados obtenidos serán una contribución al conocimiento y pueden ayudar a diseñar una posible intervención natural para la prevención del sobrepeso, la cual complementará las recomendaciones de estilos de vida saludable. Producto de su participación no se generarán incentivos económicos de ningún tipo. Sin embargo, los datos obtenidos en el estudio permitirán hacer entrega de un informe personalizado de su estado nutricional, el cual contendrá información importante que podría orientar sobre las medidas necesarias para mejorar su salud (masa, grasa, masa muscular, riesgo cardiovascular, tipo de obesidad, diagnóstico nutricional en base a IMC, perfil de presión)

Su participación no implica costo alguno para usted. Todos los requerimientos de recursos financieros para la adquisición de insumos y equipos para las mediciones serán proporcionados por el equipo de investigación.

7. Riesgos o molestias asociadas a la participación

La investigación no implica riesgo alguno para usted, su participación será personal y confidencial. Sin perjuicio de lo anterior, estará garantizada la

posibilidad de detener su participación si se sintiera afectado(a), si presentara algún tipo de malestar o decidiera retirarse sin mediar algún motivo en particular.

Como medida precautoria de resguardo de la salud, Ud. podría ser forzosamente excluido del estudio si ocurre una de las siguientes condiciones:

- 1) En las mediciones iniciales del estudio, realizadas antes de iniciar la intervención con cochayuyo, Ud registrase una glicemia basal superior a 150 mg/dL, presión sistólica mayor a 180 mmHg o presión diastólica mayor a 120 mmHg (crisis hipertensiva).
- 2) Si luego de iniciada la intervención con la infusión de cochayuyo, Ud. registra un aumento superior al 30% en los niveles de glicemia basal, presión sistólica o presión diastólica, se suspenderá su participación en el estudio.

8. Derechos

Si ha leído y firmado este documento está señalando su voluntad y decisión de participar de esta investigación. Sin embargo, podrá poner fin a ésta cuando lo desee sin ningún tipo de perjuicio en su contra.

9. Contacto

Si estima que no se ha respetado este acuerdo, podrá presentar una queja formal al Investigador Responsable, Dra. Carolina Aguirre (caguirre@ucsc.cl fono:41-2749302) y/o al Decano de la Facultad de Ciencias, Dr. Antonio Brante (abrante@ucsc.cl, fono:977689533) y/o a la Presidenta del Comité de Ética de la Universidad Católica de la Santísima Concepción, Dra. Mónica Tapia Ladino, Vicerrectora de Investigación y Postgrado (mtapia@ucsc.cl, fono: 41-2345013). Esta propuesta ha sido revisada y aprobada por el Comité Ético Científico de la Universidad Católica de la Santísima Concepción.

10. Declaración

Yo, declaro de manera libre y voluntaria, que he sido informado de los aspectos éticos de la investigación, siendo debidamente informado de los beneficios y riesgos de mi participación.



UCSC

UNIVERSIDAD CATÓLICA DE LA SANTÍSIMA CONCEPCIÓN
VICERRECTORÍA DE INVESTIGACIÓN Y POSTGRADO



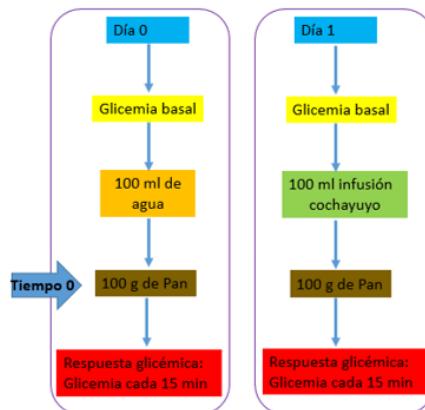
CIÉNTIFICO - TECNOLÓGICO
NUCLEO UCSC
PARA EL DESARROLLO COSTERO SUSTENTABLE

Nombre completo Participante	Firma	Fecha
Carolina Aguirre Céspedes Investigador Responsable	Firma	Fecha
Ministro de Fe	Firma	Fecha

Se deja constancia en este instante que este documento será firmado en dos copias originales, quedando una de ellas en manos de la Investigadora Responsable y la otra en manos del participante.

ANEXO: Esquema de mediciones del estudio

Efecto agudo de la infusión de cochayuyo



Programa de Recursos Naturales para la Sustentabilidad
Núcleo Científico Tecnológico para el Desarrollo Costero Sustentable, UCSC
Alonso de Ribera 2850 - Concepción - Chile
Teléfono 412345260