



Universidad de Chile

Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas

Departamento de Química Farmacológica y Toxicológica

Laboratorio de Productos Naturales

# **Identificación de la sapogenina principal de una fracción de un crudo de sapogeninas de *Quillaja saponaria* Mol. Evaluación de su efecto sobre la expresión de COX-2 en células RAW 264.7**

**MARÍA MAGDALENA PENNA RAMÍREZ**

**Memoria para optar al título de Químico Farmacéutico**

**PATROCINADOR(A):**

**DRA. Q.F. CARLA DELPORTE V.**

**DIRECTORAS DE MEMORIA:**

**DRA. Q.F. CARLA DELPORTE V.**

**DRA. B.Q. LORENA GARCÍA N.**

**Santiago, Chile**

**2012**

*“No puedo cambiar la dirección del viento, pero sí  
ajustar mis velas para llegar siempre a mi destino”*

*James Byron Dean*

## AGRADECIMIENTOS

Al término de esta etapa, quiero agradecer a todas las personas que me han apoyado en todo mi proceso universitario y el desenlace de este.

Con la mayor gratitud agradezco a todo el equipo del Laboratorio de Productos Naturales de mi casa de estudio Universidad de Chile. En primer lugar a la profesora Carla por depositar su confianza en mí para llevar a cabo esta investigación, además por su acogida en este gran equipo de trabajo y por ser la guía de todos quienes componen este grupo, que sin exagerar es una familia. A Don David Aravena por su gran paciencia, buena disposición para enseñar y sobre todo a solucionar los problemas técnicos que acontecen trabajando en el laboratorio. A mis compañeros por el apoyo y respeto, a Carlos Cartagena, Patricio Torres, León Göity, Gabriela Valenzuela, Marcelo Peña, María José Queupil, Consuelo Castro, Sylvia Arrau, Jessica Bravo, Maite Rodríguez y Cristian Cáceres.

También le doy las gracias a todas las chicas que pasaron por laboratorio y a su vez fueron una gran ayuda, a Alejandra, Denisse, Fernanda, Kathy y mis compañeras de universidad Valentina Espinoza y Ana Torres.

Agradezco de sobremana a la profesora Lorena García por todas sus enseñanzas, apoyo y su tiempo dedicado a ayudarme en la segunda parte de mi memoria, además de todo su equipo de trabajo del segundo piso. Al profesor Dante Miranda, por la acogida en su laboratorio y su gran voluntad, a don Fidel por toda su cooperación en la sala de cultivo, a Juan por su disposición y a Vivi por enseñarme las técnicas.

Agradezco con todo mi corazón a toda mi familia, a mi mamá Susana por sus consejos y su grandiosa sabiduría, a mi papá Enrique por su gran apoyo siempre, a mis hermanos Maximiliano, Enrique, Susana, Marcelo, mi prima Martha, agradezco por su paciencia y tolerancia a mi mejor compañero y amigo incondicional Felipe y finalmente a todos mis amigos de la vida.



## TABLA DE CONTENIDOS

	<b>Pág.</b>
<b>I. Introducción</b>	<b>1</b>
1.1. Biosíntesis de saponinas triterpénicas y esteroidales	2
1.2. Métodos de identificación de triterpenoides	3
1.3. Estudios farmacológicos <i>in vitro</i> e <i>in vivo</i> de saponinas triterpénicas	4
<b>II. Hipótesis</b>	<b>6</b>
<b>III. Objetivos</b>	<b>7</b>
3.1. Objetivos generales	7
3.2. Objetivos específicos	7
<b>IV. Materiales y métodos</b>	<b>8</b>
4.1. Metodología química	8
4.1.1. Hidrólisis de extracto ULTRA Dry 100Q	8
4.1.2. Fraccionamiento de hidrolizado por columnas cromatográficas (CC)	8
4.1.3. Monitorización por cromatografía en capa fina (CCF)	11
4.2. Determinación estructural	11
4.2.1. Análisis mediante CLAE-UV-IES-EM de la fracción de mediana polaridad (Pol-4)	11
4.3. Montaje de ensayos en línea celular RAW 264.7	12
4.3.1 Evaluación de la expresión de COX-2	12
4.3.2. Materiales	12
4.3.3. Células	13
4.3.4. Preparación y suplementación del medio de cultivo DMEM	13
4.3.5. Cultivo celular, etapa proliferativa	13
4.4. Ensayo de viabilidad celular con MTT utilizando ácido quillaico (AQ)	13
4.5. Ensayos para evaluar el efecto inhibitorio del AQ sobre la expresión de COX-2	14
4.5.1. Preparación del extracto proteico	14

4.5.2. Cuantificación de proteínas	15
4.5.3. Electroforesis e inmunowestern blot	15
4.6. Cuantificación de nitrito en el medio de cultivo	15
4.7. Análisis estadístico	16
<b>V. Resultados</b>	<b>17</b>
5.1. Parte química	17
5.1.1. Hidrólisis ácida del extracto acuoso de quillay (ULTRA DRY 100 Q)	17
5.1.2. Fraccionamiento de H-100 Q por CC y monitoreo por CCF	17
5.2. Análisis de Pol 4 por CLAE-UV-IES-EM	18
5.2.1. Determinación estructural de las sapogeninas de Pol-4	18
5.2.2. Ruta de fragmentación propuesta para el ácido quillaico	19
5.2.3. Ruta de fragmentación propuesta para el ácido fitolacagénico	23
5.2.4. Ruta de fragmentación propuesta del ácido 22-Hidroxi-quillaico	26
5.3. Resultados de ensayos en línea celular RAW 264.7	29
5.3.1. Ensayos de viabilidad	29
5.3.2. Efecto de AQ sobre la expresión de COX-2	31
5.3.3. Cuantificación de nitrito	32
<b>VI. Discusión</b>	<b>34</b>
<b>VII. Conclusión</b>	<b>38</b>
<b>VIII. Referencias</b>	<b>40</b>

## ÍNDICE DE FIGURAS

		Pág.
<b>Figura 1.</b>	Estructura del oleanano	3
<b>Figura 2.</b>	Estructura de una saponina del quillay cuya sapogenina es el ácido quillaico	3
<b>Figura 3.</b>	Perfil cromatográfico de los Pols	18
<b>Figura 4.</b>	Cromatograma CLAE-UV a 201 nm de Pol-4	19
<b>Figura 5.</b>	Cromatograma CLAE-UV-IES-EM <sup>1</sup> a 201 nm del ácido quillaico	20
<b>Figura 6.</b>	Espectro de masa (IES-EM <sup>2</sup> ) del ácido quillaico	21
<b>Figura 7a.</b>	Ruta de fragmentación propuesta por ácido quillaico	22
<b>Figura 7b.</b>	Ruta de fragmentación propuesta para el núcleo de ácido quillaico formado por Retro Diels-Alder	23
<b>Figura 8a</b>	Espectro EM <sup>1</sup> observado del pico 4 (ácido fitolacagénico)	24
<b>Figura 8b</b>	Espectro EM <sup>2</sup> observado del pico 4 (ácido fitolacagénico)	24
<b>Figura 9a.</b>	Primera ruta de fragmentación propuesta para el ácido fitolacagénico	25
<b>Figura 9b.</b>	Segunda ruta de fragmentación paea el ácido fitolacagénico	26
<b>Figura 10</b>	Espectro EM <sup>2</sup> obtenido para la señal m/z 501 en pico 2 (ácido 22-hidroxi-quillaico)	27
<b>Figura 11</b>	Ruta de fragmentación propuesta del ácido 22- OH quillaico	28
<b>Figura 12a.</b>	Efecto de AQ en la viabilidad celular a las 3h	28
<b>Figura 12b.</b>	Efecto del AQ en la viabilidad celular a las 6h	29
<b>Figura 12c.</b>	Efecto del AQ en la viabilidad celular a las 24h	29
<b>Figura 13.</b>	Efecto de AQ sobre la expresión de la proteína COX-2 en las células RAW 264.7	32
<b>Figura 14.</b>	Principales triterpenoides presentes en el quillay	35
<b>Figura 15.</b>	Estructura del ácido quillaico, ácido oleanólico, y dos derivados sintéticos	37

## ÍNDICE DE TABLAS

	<b>Pág.</b>
<b>Tabla 1.</b> Composición de la fase móvil de cada fracción de CC	10
<b>Tabla 2.</b> Fracciones que componen cada Pol	17
<b>Tabla 3.</b> Cuantificación de nitrito	33



## ÍNDICE DE ANEXOS

	<b>Pág.</b>
<b>Anexo 1.</b> Vías de ciclación de saponinas triterpénicas y esteroidales	43
<b>Anexo 2.</b> Cromatograma obtenido por CLAE-DAD	44
<b>Anexo 3.</b> Imagen <i>Quillaja saponaria</i> Mol.	45
<b>Anexo 4 a.</b> Flores del quillay	45
<b>Anexo 4 b.</b> Fruto del quillay	45
<b>Anexo 5.</b> Corteza del quillay	45

## ABREVIATURAS

AcEt	acetato de etilo
AQ	ácido quillaico
CC	columna cromatográfica
CCF	cromatografía en capa fina
CLAE-DAD	cromatografía líquida de alta eficiencia con detector de arreglo de diodos
CLAE-UV-IES-EM	cromatografía líquida de alta eficiencia con detector ultravioleta asociado a un espectrómetro de masas que ioniza por electrospray
COX-2	ciclooxigenasa-2
DCM	diclorometano
DMSO	dimetilsulfóxido
EtOH	etanol
FE	fase estacionaria
FM	fase móvil
H-100Q	extracto hidrolizado
HCl	ácido clorhídrico
iNOS	óxido nítrico sintasa inducible
m/z	índice masa/carga
MeOH	metanol
MS <sup>1</sup>	espectro de masa
MS <sup>2</sup>	espectro de masa/masa
NO	óxido nítrico
PBS	phosphate buffer saline
PM	peso molecular
Pol-1	fracción de compuestos apolares

Pol-2	fracción de polaridad baja
Pol-3	fracción de polaridad media-alta
Pol-4	fracción de polaridad alta
SFB	suero fetal bovino

## RESUMEN

### **Identificación de la saponina principal de una fracción de un crudo de saponinas de *Quillaja saponaria* Mol. Evaluación de su efecto sobre la expresión de COX-2 en células RAW 264.7**

Esta memoria se desarrolló con el fin de contribuir al conocimiento químico y farmacológico del quillay.

El quillay (*Quillaja saponaria* Mol., Quillajaceae) es un árbol autóctono de Chile que se encuentra mayormente entre la IV y IX región, desarrollándose principalmente en terrenos soleados. Su corteza, hojas y ramas presentan un alto contenido de saponinas triterpénicas. Estos compuestos tienen la propiedad de tensoactivos, por lo que poseen un amplio uso en la industria cosmética y alimentaria.

Se utilizó un extracto comercial rico en saponinas del quillay, el cual se sometió a hidrólisis ácida para obtener el producto de hidrólisis (H-100Q) rico en saponinas. Este hidrolizado fue fraccionado mediante sucesivas CC con relleno de sílica gel 60, con la finalidad de separar las saponinas por su polaridad. De acuerdo a este procedimiento se formaron 5 grupos denominados Pol-1, Pol-2, Pol-3, Pol-4 y Pol-5.

Se trabajó con la fracción de polaridad media alta Pol4, la cual se sometió a la técnica de separación analítica CLAE asociada a detección UV y IES-EM. Fue analizado tanto el cromatograma obtenido como los espectros de masa, de los cuales se determinó la presencia de ácido quillaico como saponina mayoritaria, ácido fitolacagénico y ácido 22-OH quillaico. Para estas tres saponinas se propuso una ruta de fragmentación molecular, con el fin de identificar futuros compuestos de núcleos triterpénicos pentacíclicos.

Se evaluó el efecto del ácido quillaico sobre la expresión de la COX-2 y la producción de nitrito en el medio de cultivo con la línea celular de macrófago de ratón RAW 264.7. En consecuencia se montó y estandarizó la metodología de cultivo celular, viabilidad celular e inmunowestern blot.

Los resultados demuestran que no hay efecto inhibitorio del ácido quillaico sobre la expresión de la COX-2, así mismo para la cuantificación de nitritos en el medio de cultivo, comparado con las células estimuladas con y sin LPS.

## SUMMARY

### **Identification of the main saponin a fraction of a crude *Quillaja saponaria* Mol. saponin. Evaluation of its effect on COX-2 expression in RAW 264.7 cells**

This research was developed in order to contribute to the chemical and pharmacological knowledge of the quillaja.

The quillaja (*Quillaja saponaria* Mol., Quillajaceae family) is a tree native to Chile which is mostly found between the IV and IX región, developed mainly in sunny areas. Its bark, leaves and braches have a high content of triterpene saponins. These compounds have the property of surfactants, therefore widely used in the cosmetics and alimentary industry.

We used a commercial extract rich in quillaja saponins, which was subjected to acid hydrolysis to obtain hydrolysis product (H-100Q) rich in saponin. This hydrolyzed was fractionated by successive sílica gel 60 chromatographic columns, with the purpose of separating the saponins by polarities. According to this procedure were formed groups called Pol-1, Pol-2, Pol-3, Pol-4 and Pol-5.

We worked with the high medium polarity fraction called Pol-4, which was subjected to analytical technique HPLC associated to the UV and ESI-MS. Was analyzed both the cromatogram and mass spectra, which indicated the presence of saponins as mainly quillaic acid, phytolacagenic acid and 22- hydroxy quillaic acid. For these three saponins proposed a molecular fragmentation route in order to identify further compounds of pentacyclic triterpene aglycone.

We evaluated the effects of the quillaic acid on COX-2 expression and the production of nitric oxide on LPS-induced murine macrophages cell line RAW 264.7, thus we mounted and standardized cell culture, assessment of cell viability and western blot analysis.

Quillaic acid did not exhibit inhibitory effect both COX-2 expression and concentration of nitrite in culture supernatants on presence or absence of LPS.

## I. INTRODUCCIÓN

Los productos naturales siempre han sido una valiosa fuente para la investigación, en los cuales se sigue buscando nuevos usos y por sobre todo la contribución de la composición química y su relación con las actividades terapéuticas que pueden tener estos en el ser humano.

Un sinnúmero de especies de especies vegetales hoy en día, están siendo estudiadas con el fin de encontrar nuevos metabolitos secundarios bioactivos. La especie que se investigará en esta memoria es el “quillay”. Éste es una fuente muy importante de compuestos farmacológicamente activos, a los cuales se les debe demostrar el mecanismo de acción y eventualmente podrían surgir nuevas rutas de acción farmacológica.

El quillay o *Quillaja saponaria* Mol., Quillajaceae, es un árbol autóctono de Chile ubicado tanto en el litoral como en el valle central y la precordillera, entre Coquimbo y Malleco (IV y IX Regiones respectivamente), el cual se desarrolla preferentemente en terrenos y laderas asoleadas, las que pueden llegar hasta los 1500 m s.n.m. (Gupta, 2008).

Alcanza alturas de hasta 15 m, con un tronco de hasta 1 m de diámetro, su corteza es cenicienta rasgada longitudinalmente; de ramitas pubescentes; hojas persistentes, de color verde amarillenta. Sus flores son blanquecinas, aplanadas y el fruto formado por 5 folículos bivalvos (Gupta, 2008).

En Chile su uso folklórico es diverso. Se utiliza una infusión de hojas y la corteza para combatir la tos y la bronquitis. La decocción de su corteza, se emplea para tratar heridas crónicas y escamosas de la piel. Un macerado de la corteza desmenuzada es útil para “afirmar el cabello” y tratar la seborrea (Gupta, 2008).

Además el quillay en su totalidad es una de las principales fuentes industriales de saponinas triterpénicas (San Martín y Briones, 1999). Por décadas, los extractos de corteza quillay han sido ampliamente usados en las industrias de alimentos y cosméticas por sus propiedades biológicas y fisicoquímicas (Van Setten, 1998).

El extracto acuoso obtenido desde la biomasa de quillay, es rico en saponinas cuya sapogenina mayoritaria es el ácido quillaico (Cartagena, 2010; Rodríguez-Díaz, 2011). Recientemente en el laboratorio de Productos Naturales de nuestra Facultad, han sido aislados otros triterpenoides desde el extracto acuoso de corteza de quillay como son el ácido fitolacagénico, un isómero estructural del ácido quillaico, entre otros que están en vías de identificación (Cartagena, 2010).

Las saponinas son glicósidos que están ampliamente distribuidos en el reino vegetal. La presencia de éstas se han reportado en más de 100 familias de plantas, así como también de algunas fuentes marinas (Hostettmann y Marston, 1995).

Las saponinas se distribuyen mayormente en dos principales clases del reino vegetal, la primera es Magnoliopsida o dicotiledóneas y la Liliopsida o monocotiledóneas. Las saponinas triterpénicas están distribuidas principalmente en la clase de las dicotiledóneas. Nuestra especie en estudio se encuentra en la subclase Rosidae, del orden Rosales y la familia Quillajaceae (Van Setten, 1998; Vincken y cols., 2007).

Según su estructura química se clasifican en saponinas esteroidales y saponinas triterpénicas. Éstas están formadas por un núcleo principal apolar llamado aglicona y diversos monosacáridos polares. Se pueden clasificar en monodesmósidas cuando tienen los azúcares unidos a un C, por lo general al C3, y bidesmósida cuando tienen unidos a la aglicona azúcares en dos carbonos, generalmente al C3 y al C28 como unión esterificada (Bomford y cols, 1997; Pham y cols., 2006).

Los monosacáridos más comunes que se pueden encontrar en las saponinas son D-glucosa, D-galactosa, ácido glucurónico, ácido galacturónico, L-ramnosa, L-arabinosa, D-xilosa y D-fucosa (Vincken y cols, 2007).

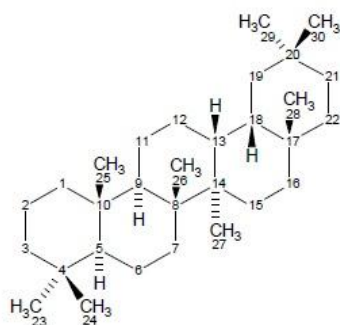
La combinación de estos elementos polares y apolares en dichos heterósidos, le dan a las saponinas la característica de tensoactivas en soluciones acuosas, similares al jabón (Oleszek, 2006; Vincken y cols, 2007).

### **1.1. Biosíntesis de saponinas triterpénicas y esteroidales**

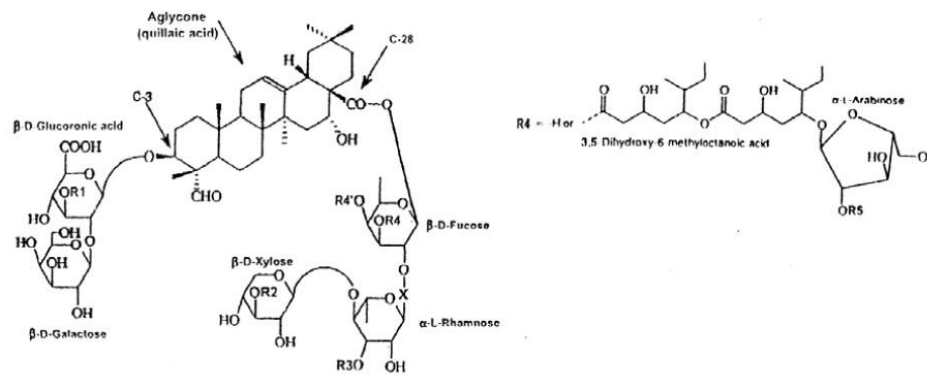
La biosíntesis de las saponinas triperpénicas y esteroidales parte de la unión cabeza cola de 6 unidades de isopreno (2-metil-1,3- butadieno), las cuales derivan del escualeno, seguidos por una ciclación continua. La ciclación sucesiva producida por ciclasas forman al óxidoescualeno (2,3-epóxido escualeno), el que luego de la apertura del epóxido y vías de protonación se crea un carbocatión con la capacidad de someterse a varios tipos de reacciones de ciclación. La principal ciclación y sucesivas reacciones de reordenamiento producen los esqueletos esteroidales y triterpénicos (Hostettmann y Marston, 1995; Vincken y cols, 2007), ver Anexo 1.

Los triterpenos cuentan con 30 átomos de carbono, mientras que los esteroides sólo tienen 27 átomos de carbono.

Las saponinas triterpénicas pentacíclicas pueden derivar de 3 núcleos: lupano, ursano y oleanano. Las saponinas del quillay corresponden a la familia del oleanano, como se puede observar en las Figuras 1 y 2 se muestra el núcleo del oleanano y un ejemplo de una saponina del quillay (Resnik, 2004).



**Figura 1.** Estructura del oleanano



**Figura 2.** Estructura de una saponina del quillay, cuya sapogenina es el ácido quillaico

## 1.2. Métodos de identificación de triterpenoides

Es un desafío llegar a la separación de los triterpenoides, debido a que por lo general las sapogeninas están presentes como mezclas de compuestos de estructura y polaridad similar. Es por esta razón, que se utilizan en forma complementaria diversas técnicas de separación e identificación (Bankefors, 2010).



Algunas de dichas técnicas son cromatografía preparativa, columnas cromatográficas con distintos adsorbentes como sílica normal y C-18 y Sephadex LH-20. Otra técnica que se utiliza para la identificación y caracterización de saponinas triterpénicas es la cromatografía líquida de alta eficiencia acoplada a espectrómetro de masas (CLAE-EM) (Oleszek, 2006; Bankefors, 2010).

En esta memoria se utilizará la técnica de CLAE asociado a detector UV, espectrómetro de masas de tipo electrospray, para lograr dilucidar la identificación de sapogeninas en una mezcla compleja y proponer las rutas y mecanismos de fragmentación.

### **1.3. Estudios farmacológicos *in vivo* e *in vitro* de saponinas triterpénicas**

A nivel biológico las saponinas reportan variadas investigaciones que sustentan la actividad farmacológica que poseen ya sea tanto en estudios *in vivo* como *in vitro*. A muchos de estos heterósidos se les ha demostrado la propiedad antiinflamatoria, antinociceptiva (Arrau y cols., 2011), anticancerígenas, antivárica, estimuladora de la secreción de insulina (Chang y cols) y antialérgica. Además, se ha demostrado toxicidad para insectos y parásitos, siendo insecticida, antihelmíntico, antifúngico, antiviral y antibacterial (Güçlü-Üstündağ, 2007; Hosttemann y Marston, 1995; San Matín R y Magunacelaya, 2005).

En estudios previos realizados en el laboratorio de productos naturales de esta Facultad, se demostró el efecto antinociceptivo *in vivo* del producto de hidrólisis obtenido desde el extracto acuoso de quillay, el ácido quillaico y derivados sintéticos (Arrau y cols, 2011).

Otras investigaciones han probado las propiedades adyuvantes de las saponinas aisladas del extracto acuoso de la corteza de quillay, aumentando la respuesta inmune en vacunas, donde la combinación de estas saponinas con el colesterol y fosfolípidos forma los Complejos Inmunoestimulantes (ISCOMs) (Pham, 2006., 2006; Van Setten y cols., 1998)

Se ha demostrado también que el extracto acuoso de saponinas, así como sus triterpenoides aislados han inhibido la actividad y la expresión de enzimas pro-inflamatorias como la ciclooxigenasa-1 (COX-1), ciclooxigenasa-2 (COX-2), óxido nítrico sintasa inducible (iNOS) y la 15- lipooxigenasa (Ringbom y cols., 1998; Suh y cols., 1998; Orellana, 2011) especialmente en estudios relacionados con el cáncer, diabetes así como también por la disminución de prostaglandinas como la PGE<sub>2</sub>, nitritos, expresión de Factor Necrótico Tumoral  $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ), entre otros (Takada y cols., 2010; Park y cols., 2004), por lo general estos estudios *in vitro* se realizan en células del sistema inmune, como la línea celular macrófagos de ratón RAW 264.7, células endoteliales, líneas células tumorales,

entre otras (Suh y cols., 1998; Park y cols., 2004; Suh S.J. y cols., 2007; Takadaa y cols., 2010; An H.J. y cols., 2011).

De acuerdo a estos antecedentes anteriormente señalados, es de gran importancia investigar *in vitro* la acción que podrían ejercer las sapogeninas del quillay en la expresión de estas enzimas proinflamatorias, razón por la cual en esta investigación se implementará y estandarizará la técnica correspondiente a la evaluación de la inhibición de la expresión de la enzima COX-2 en la línea celular RAW 264.7, inducidas por lipopolisacáridos (LPS).

## II. HIPÓTESIS

La fracción de polaridad intermedia obtenida de un crudo de sapogeninas proveniente de un extracto acuoso de quillay inhibe la expresión de COX-2 y este efecto se debe a su sapogenina principal la que será identificada junto con las principales sapogeninas de dicho extracto, con las técnicas analíticas CLAE-UV-IES-EM.

La hipótesis anteriormente señalada se basa en estudios anteriores en los que se ha descrito que triterpenoides pentacíclicos inhiben la expresión de enzimas iNOS y COX-2 (Ringbom y cols. 1998; Suh y cols., 1998).

Otro antecedente que soporta esta hipótesis es que el ácido quillaico, sapogenina mayoritaria del producto de hidrólisis presentó una significativa actividad antiinflamatoria *in vivo* cuyo mecanismo podría ser a través de la inhibición de estas enzimas (Arrau y cols., 2011; Rodríguez- Díaz y cols., 2011).

### III. OBJETIVOS

#### 3.1. Objetivo general

- Contribuir al conocimiento de la composición química y farmacológica de *Quillaja saponaria*.

#### 3.2. Objetivos específicos

- Identificar la sapogenina mayoritaria y otras sapogeninas presentes en una de las fracciones de polaridad intermedia obtenida de un crudo de sapogeninas proveniente desde el extracto acuoso de quillay.
- Postular una posible ruta de fragmentación para las principales sapogeninas identificadas en la fracción de polaridad intermedia.
- Montar y estandarizar la técnica de inmunowestern blot para la detección de COX-2 en la línea celular RAW 264.7.
- Evaluar la inhibición de la expresión de COX-2 por la sapogenina mayoritaria de la fracción de polaridad intermedia proveniente de la hidrólisis del extracto acuoso de quillay.

## IV. MATERIALES Y MÉTODOS

### 4.1. Parte química

#### 4.1.1. Hidrólisis ácida del extracto acuoso de quillay

Para la hidrólisis se utilizó el producto comercial Ultra Dry 100Q correspondiente a un extracto acuoso purificado de la biomasa de quillay, rico en saponinas.

Para la hidrólisis, se pesaron 20,0 g de extracto Ultra Dry 100 Q, al que se le adicionó 500 mL de HCl al 18% sometiéndolo a calentamiento a reflujo por 2 h. Al sólido remanente obtenido, se le realizaron 2 lavados de 10 mL cada uno, con una solución de NaOH 0,05 M, para eliminar todos los residuos de sustancias solubles en agua. Finalmente, se lavó con abundante agua destilada hasta llegar a un pH neutro obteniendo el producto de hidrólisis (H-100Q) desde el extracto acuoso de quillay. El H-100Q se secó en estufa a 40 °C (Cartagena, 2010).

#### 4.1.2. Fraccionamiento del H-100Q por columna cromatográfica (CC) rellena de sílica gel 60

El producto de hidrólisis obtenido fue sometido a fraccionamiento por CC. Primero se armó la “cabeza” de la columna que corresponde a 6 g de H-100Q, luego fue mezclado con igual cantidad de sílica gel 60 en un mortero con acetato de etilo (AcEt) para ayudar la homogenización.

La mezcla se llevó a estufa hasta que el solvente se volatilizó completamente. Una vez seco se tamizó, obteniendo la cabeza de la CC.

Para armar el cuerpo de la CC, se procedió a pesar sílica gel en una cantidad 5 veces más que la cabeza.

Luego de la elección de la columna, ésta se colocó sobre un matraz kitasato de 500 mL conectado al vacío. Para armarla se colocó un papel filtro sobre la frica y se agregó la sílica por la técnica de empaquetamiento en seco, es decir, se agregó la sílica en seco a la columna, donde se aplicó presión mecánica para que quedara compacta a lo largo del cuerpo de la columna. Posteriormente se eluyó con 200 mL de diclorometano (DCM). Conectado al vacío se esperó que la sílica decantara y que idealmente quedara con una superficie plana. Al estar plana se colocaron dos papeles filtros sobre ella, seguido de 2 cm de arena o de algodón y finalmente la cabeza sobre la cual se colocó un último papel filtro. Se tomó en consideración que los papeles filtros deben ser del mismo diámetro de la columna para evitar la filtración de la cabeza sobre el cuerpo de la columna.

Para eluir la muestra, se conectó nuevamente el vacío y se procedió a eluir 200mL de fase móvil y cuando la columna dejó de eluir, se cortó el vacío. Este procedimiento se realizó sucesivamente para cada volumen de solventes agregados a la CC.

La fase móvil consistió en una mezcla de DCM y AcEt en distintas proporciones. Ver Tabla 1.

Detalle de las CC que fueron utilizadas:

- Sílica: sílica gel 60 (0,063 – 0,2 mm)
- Volumen de solvente a eluir: 200 mL
- Altura de cabeza: 1,2 cm ( 7,0 ± 0,6 g. de muestra + 7,0 g. sílica)
- Altura de cuerpo: 19 cm
- Altura de algodón: 1,2 cm
- Diámetro de columna: 5,5 cm
- Composición fase móvil: ver en **Tabla 1**

**Tabla 1.** Composición de fracción de CC

Fracción	Fase móvil
1	DCM 100%
2	DCM: AcEt 95:5
3	DCM: AcEt 90:10
4	DCM: AcEt 85:15
5	DCM: AcEt 80:20
6	DCM: AcEt 75:25
7	DCM: AcEt 70:30
8a,8b,8c,8d	DCM: AcEt 65:35
9	DCM: AcEt 60:40
10	DCM: AcEt 55:45
11	DCM: AcEt 50:50
12	DCM: AcEt 45:55
13	DCM: AcEt 40:60
14	DCM: AcEt 35:65
15	DCM: AcEt 30:70
16	DCM: AcEt 25:75
17	DCM: AcEt 20:80
18	DCM: AcEt 15:85
19	DCM: AcEt 10:90
20	DCM: AcEt 5:95
21	AcEt 100%
22	AcEt: Metanol 75:25
23	AcEt: Metanol 50:50
24	AcEt: Metanol 25:75
25	Metanol 100%

la fase móvil de cada

Cada fracción se monitoreó por la técnica de cromatografía en capa fina (CCF), para separarlas por sus distintos perfiles cromatográficos (Cartagena, 2010), para lo cual cada una fue concentrada en el rotavapor.

#### **4.1.3. Monitoreo por CCF**

Cada fracción obtenida en la CC se sembró lo suficientemente concentrada en un cromatofolio de sílica gel 60. Se preparó previamente la cámara con la fase móvil de DCM:AcEt (1:1). Al estar saturado el sistema se colocó el cromatofolio en el interior de la cámara. Al llegar la fase móvil hasta aproximadamente 1 cm del borde superior del cromatofolio (frente de solvente), se procedió al revelado del cromatofolio. Primero se llevó a luz UV (366 nm) con el fin de observar los compuestos fluorescentes (compuestos fenólicos) y finalmente se procedió a pulverizar con el revelador y luego a calentar el cromatofolio a 100 °C, hasta la aparición del color de los compuestos presentes en la fracción.

El revelador utilizado fue p-anisaldehído sulfúrico, el cual se preparó con metanol, ácido acético glacial, ácido sulfúrico concentrado anisaldehído (17:2:1:0,1)

Para descartar posibles compuestos fenólicos presentes en la muestra, el cromatofolio fue pulverizado con el revelador natural product/polietilenglicol (NP/PEG) y se observó a la luz UV a 366 nm.

### **4.2. Determinación estructural**

#### **4.2.1. Análisis de fracción de polaridad intermedia-alta (Pol-4) por cromatografía líquida de alta eficiencia acoplado a espectrometría de masas (CLAE-UV-IES-EM)**

Para la identificación de los compuestos presentes en la fracción de polaridad media alta, se sometió a Pol 4 a separación analítica CLAE asociada a detección UV y IES-EM y se complementó además con información obtenida de distintas publicaciones para la determinación estructural de los triterpenoides presentes en la muestra.

El sistema CLAE-UV-IES-EM consistió de un cromatógrafo líquido de alta eficacia CLAE Agilent 1100 (Agilent Technologies Inc) acoplado a espectrómetro de masas de tipo electrospray - trampa iónica (IES-IT) Esquire 4000 (Bruker Daltonik GmbH, Alemania).

Para el control del sistema CLAE se utilizó el programa ChemStation for LC 3D Rev. A.10.02 (Agilent Technologies Inc., CA-USA) y para el control del espectrómetro se utilizó el programa



esquireControl 5.2 (Bruker Daltonik GmbH, Alemania); para la separación CLAE se utilizó una columna Zorbax Eclipse XDB-C18 150×4.6 mm, 5 µm y 80Å (Agilent Technologies Inc., CA-USA), un flujo de 0,8 mL/min, una fase móvil isocrática de ácido fórmico 0.1% v/v y acetonitrilo (40%:60%), el volumen de inyección fue de 20 µL, la detección UV a 201 nm y detección EM en polaridad negativa; concentración de la muestra: 0,85 mg/mL; la separación de la muestra se realizó a T° ambiente.

El proceso de ionización (nebulización) mediante electrospray se realizó a 3000 V asistido por nitrógeno como gas nebulizador a una presión de 30 psi nitrógeno como gas de secado a una temperatura de 325°C y flujo de 10 L/min. Los cromatogramas y espectros de masas se adquirieron en polaridad negativa para el intervalo de barrido de 20-1000 m/z.

### **4.3. Montaje de ensayos farmacológicos en línea celular RAW 264.7**

#### **4.3.1. Evaluación de la expresión de COX-2**

Para evaluar la expresión de la enzima pro-inflamatoria COX-2 se montó un ensayo farmacológico en la línea celular de macrófagos murinos RAW 264.7. Para esto se realizó un estudio de la viabilidad celular en presencia de LPS y AQ, y posteriormente por inmunowestern blot se evaluó si AQ inhibe la expresión de COX-2 en presencia de LPS. Además, el estudio se complementó con una detección de nitrito en el medio de cultivo para evidenciar disminución de la producción de este ión como índice indirecto de la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS).

#### **4.3.2. Materiales:**

Medio de cultivo celular Dulbecco's Modified Eagles Medium (DMEM), Sigma (D1152); suero fetal bovino (SFB) Life Technologies; L-glutamina 100x (200 mM) Gibsco, gentamicina (10 mg/mL) US biological; penicilina (10000 U/mL); estreptomycin (10 mg/mL); placas de cultivo celular Falcon 100, 60 y 35 mm de diámetro; rastrillo o *cell scraper* Orange; tubo de centrifuga para cultivo de 15 y 50 mL Falcon; azul de tripán, cámara de Neubauer; placas de 24 pocillos Falcon; LPS (lipopolisacárido) Sigma L4516 de *Escherichia coli*; inhibidores de proteasas Sigma (P8340); dimetilsulfóxido (DMSO); buffer fosfato salino (PBS); MTT [3-(4,5-dimetiltiazol-2il)-2,5 difenil tetrazolio] Merck; RIPA (*Radioimmunoprecipitation assay buffer*) compuesto por Tris 50 mM, NaCl 150 mM, SDS 0,1%, deoxicolato de sodio 0,5%, Tritón X-100 0,5%; campana de cultivo de doble flujo (Ehret Ripl. Ing. W. Ehret GmbH); anticuerpo primario policlonal anti COX-2 (1

mg/mL), Chemicon International (AB5118); anticuerpo secundario policlonal acoplado a peroxidasa anti-conejo, Calbiochem (H01315); anticuerpo monoclonal anti- $\beta$ -tubulina Sigma (T0198), anticuerpo secundario monoclonal acoplado a peroxidasa, Calbiochem (A2304).

#### **4.3.3. Células**

Se utilizó la línea celular RAW 264.7, la que fue cultivada en medio DMEM suplementado al 10% con SFB, 1% de glutamina 2 mM, 0,1% de gentamicina más un cóctel de penicilina con estreptomycinina al 1%, en una estufa a 37 °C en una atmósfera húmeda con 5% de CO<sub>2</sub>. (Hseu y cols., 2005; Pokharel y cols., 2006).

#### **4.3.4. Preparación y suplementación del medio de cultivo DMEM**

El DMEM fue preparado según la ficha técnica de Sigma. El polvo se reconstituyó en 900 mL de agua nanopura (agua filtrada y tratada con resina de intercambio iónico), luego se agregó 3,7 g de bicarbonato de sodio y 10 mL del cóctel de penicilina y estreptomycinina. Todo se mezcló con un agitador magnético y luego se completó con agua hasta un litro. Se midió el pH final, el cual siempre fue 7,2. Este medio incompleto se llevó a campana de flujo laminar y se filtró con papel filtro de 0,22 µm en una botella estéril. Para suplementar el DMEM, se tomaron 200 mL del medio incompleto y se le agregó 20 mL de SFB, 2 mL de glutamina a una concentración de 200 mM y 200 µL de gentamicina. Todo esto fue realizado bajo campana de flujo laminar y luego almacenado entre 2-8 °C.

#### **4.3.5. Cultivo celular, etapa proliferativa**

Para los experimentos de viabilidad e inmunowestern blot se trabajó a un 80% de confluencia (100% de confluencia corresponde a la ocupación total de la superficie de la placa por una monocapa celular). Para obtener el número de placas necesarias en cada uno de los set experimentales, las células se descongelaron y se cultivaron a confluencia en placas de 100 mm, luego se realizaron sub-cultivos en el mismo tipo de placas. Para esto, las células se soltaron de la superficie utilizando la técnica del raspado y/o tripsinación al 0,016%, se contaron por la técnica de azul de tripán en cámara de Neubauer, luego se sembraron  $8 \times 10^5$  células por placa y éstas fueron incubadas por 48 h. Las células de estas nuevas placas se rastrillaron y se contaron para sembrar un número determinado para posteriormente trabajar en un 80% de confluencia.

#### **4.4. Ensayo de viabilidad celular con MTT**

Los ensayos de viabilidad celular fueron realizados en placas de cultivo celular de 24 pocillos. Las células pre-cultivadas fueron previamente disgregadas para sembrar la cantidad de células adecuadas dependiendo de las horas de ensayo en pocillos que contenían 1 mL de DMEM suplementado. Para el ensayo de viabilidad a las 24 h se sembraron  $3,5 \times 10^5$  células y para el de las 3 y 6 h se sembraron  $4,5 \times 10^5$  células por pocillo. Luego, se pre-incubaron en estufa de cultivo por 1h para permitir que se adhirieran a la placa. El AQ se preparó por disolución en DMSO (la concentración del DMSO en todos los ensayos fue  $<0,05\%$ ). Pasado este tiempo se agregó AQ a una concentración final de 0,1; 1; 10; 20 y 30  $\mu\text{g/mL}$ , además se realizaron los respectivos controles de las células incubadas solamente en medio y con DMSO para descartar efecto del solvente. La placa se llevó a estufa por 30 min y luego fue agregado el LPS en los pocillos correspondientes. Las placas fueron incubadas por 3, 6 y 24 h. Los pocillos fueron lavados con PBS estéril y posteriormente se agregaron 200  $\mu\text{L}$  de la solución de MTT (0,5  $\text{mg/mL}$ ). Después de 3 h de incubación a  $37^\circ\text{C}$  el MTT fue reducido a formazán. El MTT de cada pocillo fue removido y los cristales violetas de formazán creados por la reducción del MTT por la enzima deshidrogenasa mitocondrial se solubilizaron con 1 mL de isopropanol acidificado. Se leyó la absorbancia a 550 y a 650 nm (Pokarhel y cols., 2006).

#### **4.5. Ensayos para evaluar el efecto inhibitorio del AQ sobre la expresión de COX-2**

Para evaluar el efecto inhibitorio del AQ sobre la expresión de COX-2 por acción LPS, las células pre-cultivadas fueron previamente disgregadas para sembrar  $5,5 \times 10^5$  células por placa de 35 mm de diámetro, de manera de obtener el 80% de confluencia, luego se incubaron por 1 h para permitir la adherencia a la superficie de la placa. Las células se pre-incubaron 30 min con AQ a una concentración final de 0,1; 1 y 10  $\mu\text{g/mL}$  y luego se les adicionó LPS a concentración final 1  $\mu\text{g/mL}$ , el ensayo para evaluar el efecto del AQ se realizó por 24 horas. El tiempo de ensayo y las concentraciones de AQ se determinaron del estudio de viabilidad.

##### **4.5.1. Preparación del extracto proteico**

A las 24 h se retiraron las placas del incubador y se colocaron en hielo fuera de la campana. Se procedió a retirar 1 mL de medio para posterior ensayo de  $\text{NO}_2^-$ . Se eliminó el resto y se continuó con dos lavados de PBS no estéril. Se agregó a cada placa una mezcla de RIPA más inhibidores de proteasas (*AEBSF*, *aprotinina*, *clorhidrato de bestatina*, *N-(trans-Epoxy succinil)-L-leucina*, *pestatina A*, *hemisulfato de leupeptina*) ( $\sim 40 \mu\text{L/placa}$ ). Luego se rastrilló cada placa para extraer todo cuantitativamente en un tubo eppendorf rotulado para cada placa. Los tubos se centrifugaron a

10.000 rpm/10 min a 4°C. Se recuperó todo el sobrenadante que es la muestra de interés (> cantidad de proteínas totales) la cual fue guardada a -80°C hasta su uso.

#### **4.5.2. Cuantificación de proteínas**

Las proteínas obtenidas en el extracto se cuantificaron espectrofotométricamente por el método de Bradford en lector de microplaca a 595 nm. Como estándar se utilizó albúmina sérica de bovino.

#### **4.5.3. Electroforesis e inmunowestern blot**

Una vez cuantificadas las proteínas de cada una de las muestras, se realizó una electroforesis en geles de poliacrilamida en condiciones denaturantes en presencia de dodecilsulfato de sodio (SDS-PAGE). Para esto se prepararon 40 µg de proteína de cada una de las muestras en buffer Laemmli (glicerol 6,3 %, β-mercaptoetanol 2,8 %, SDS 1,3 %, Tris-HCl 0,38 %, azul de bromofenol 0,003 %, pH 6,8) y se hirvieron por 5 min. Una vez hervidas, se cargaron 40 µg de proteínas en un gel al 10% (gel separador) y 5% (gel concentrador). La electroforesis se corrió a 110 volt por 2 hrs en un buffer compuesto por Tris-HCl 48 mM, glicina 39 mM, 0,1% SDS, pH 8,8. Una vez terminada la corrida, las proteínas se transfirieron a una membrana de nitrocelulosa utilizando un sistema de transferencia líquida en buffer Tris-HCl 48 mM, glicina 39 mM y metanol 20% a 400 mA por 90 min. Una vez transferidas las proteínas se realizó la detección inmunológica, para esto la membrana se bloqueó con leche descremada al 3% en TBS (Tris buffer saline) más 0,1% Tween-20. Luego, se incubó con el anticuerpo primario policlonal anti-COX-2 (1:1000) en la misma solución de bloqueo por toda la noche a 4°C. Finalizada esta etapa la membrana se lavó con TBS 0,1% Tween-20 por tres veces, para continuar con la incubación por una hora con un anticuerpo secundario policlonal conjugado con peroxidasa. Luego, la membrana se lavó nuevamente 3 veces con TBS 0,1% Tween-20 y se procedió a revelar con el método de quimioluminiscencia. Se utilizó como control de carga β-tubulina. El análisis densitométrico se realizó utilizando el programa UN-SCAN-IT.

#### **4.6. Cuantificación de nitrito en el medio de cultivo**

La concentración de nitrito, como un producto estable de la producción de NO ocasionada por procesos inflamatorios se determinó utilizando el método de Griess. Un mL del sobrenadante del cultivo de cada una de las placas del set experimental para el estudio de la expresión de COX-2, se apartó y se utilizó para cuantificar este metabolito. 66 µL de cada uno de los sobrenadantes fue

mezclado con la misma cantidad de agua y reactivo de Griess (igual volumen de sulfonilamida al 2% (p/v) en 5 % HCl y naftilendiamina clorhídrica al 1% (p/v) en agua). Se incubó a temperatura ambiente por 10 min. La absorbancia fue medida a 560 nm en lector de microplaca. Como estándar se utilizó nitrito de sodio y los resultados se expresaron  $\mu\text{M}$ .

#### **4.7. Análisis estadístico**

Los valores fueron representados por la media  $\pm$  SEM de al menos cuatro experimentos independientes. Los valores estadísticamente significativos se compararon usando ANOVA y el test de Dunnett, y los valores  $p < 0,05$  fueron considerados estadísticamente significativos.

## V. RESULTADOS

Para una mayor comprensión, los resultados se han dividido en dos secciones, la primera es la parte química, identificación de los compuestos de interés y determinación estructural, la segunda parte, correspondiente a estudios preliminares para evaluar *in vitro* la posible acción inhibitoria del AQ sobre la expresión de COX-2, enzima involucrada en procesos inflamatorios.

### 5.1 Parte química

#### 5.1.1. Hidrólisis ácida del extracto acuoso de quillay (ULTRA DRY 100 Q)

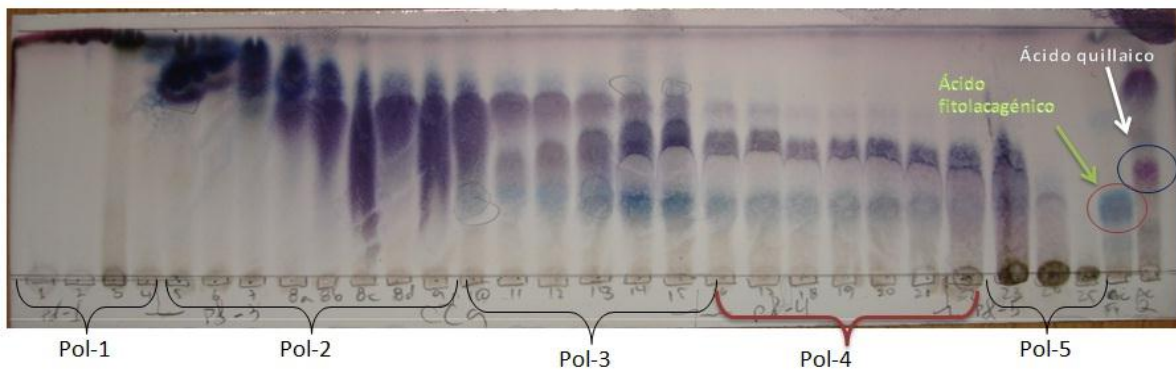
Luego de realizar la hidrólisis ácida seguida de 2 lavados de solución básica, el rendimiento obtenido del producto de hidrólisis fue  $40,4 \pm 2,0$  % a partir de los 20 g de extracto inicial.

#### 5.1.2. Fraccionamiento de H-100Q por CC y monitoreo por CCF

Las fracciones se monitorearon por CCF (Figura 3) y por la similitud de los perfiles cromatográficos se reunieron las fracciones similares, de acuerdo a esto, como se observa en la Tabla 2 se obtuvieron 5 grupos (Pol), determinados por la polaridad de sus compuestos.

**Tabla 2.** Fracciones que componen cada Pol, polaridad determinada y los rendimientos obtenidos. Pol: grupo de compuestos; DS: desviación estándar

Pol	Fracciones	Polaridad	% rendimiento $\pm$ DS
Pol-1	1-4	apolar	$2,0 \pm 1,6$
Pol-2	5-9	polaridad media-baja	$22,3 \pm 8,0$
Pol-3	10-15	polaridad media	$11,4 \pm 5,6$
Pol-4	16-22	polaridad media-alta	$4,6 \pm 2,2$
Pol-5	23-25	polaridad alta	$10,6 \pm 3,9$



**Figura 3.** Perfil cromatográficos de las distintas fracciones, las cuales se agrupan en 5 grupos según la polaridad de los compuestos. Definidas como Pol-1, Pol-2, Pol-3, Pol-4 y Pol-5. FE: sílica gel 60; FM: DCM:AcEt (1:1); revelador: p-anisaldehído sulfúrico.

## 5.2. Análisis de Pol 4 por CLAE-UV-IES-EM

Luego de obtener el cromatograma UV por la técnica de CLAE-UV, se pudo observar que en Pol-4 está presente el ácido quillaico (ácido  $3\beta$ ,  $16\alpha$ -dihidroxi-23oxoolean-12-en-28-oico) debido al tiempo de retención de 11.8 min, y además por ser el compuesto mayoritario de la muestra, confirmando lo descrito por Cartagena (2010) y Rodríguez-Díaz y cols., (2011), presentado en el cromatograma obtenido por la técnica CLAE-DAD mostrada en el Anexo 2.

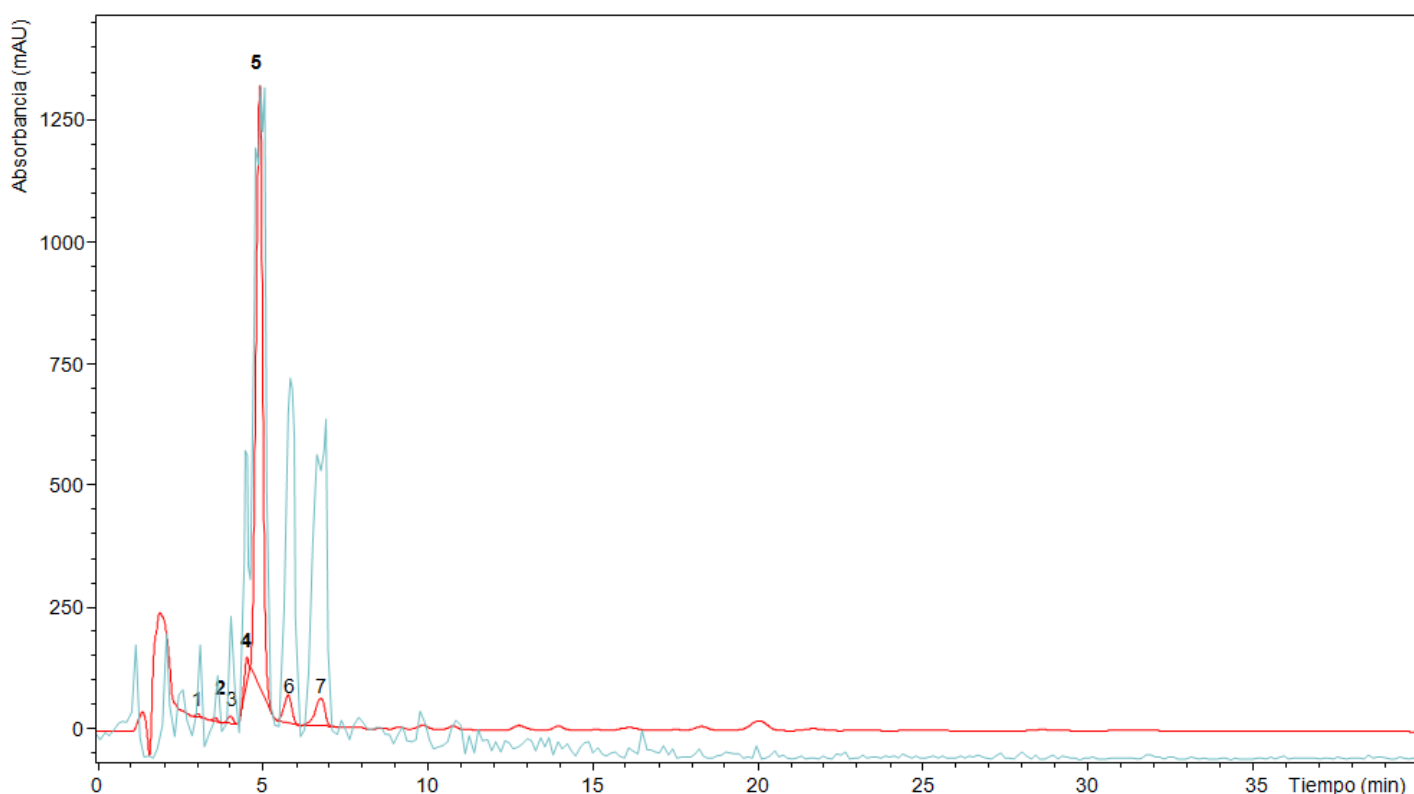
Se continuó con la búsqueda de otros compuestos en Pol-4 utilizando la técnica CLAE-UV-IES-EM mediante el análisis de las señales  $m/z$  de los espectros de masa.

### 5.2.1. Determinación estructural de las sapogeninas de Pol 4

El análisis de Pol-4 utilizando CLAE-UV-IES-EM mostró la presencia de siete picos cromatográficos importantes, los espectros de masas y fragmentación se analizaron en orden de obtener la identificación de sapogeninas triterpénicas. En base a datos entregados por CLAE-DAD (Cartagena, 2010), y CLAE-UV el pico principal (pico 5), correspondería a ácido quillaico, (Figura 4) en función de sus espectros experimentales de masa y fragmentación más algunos datos de literatura de fragmentaciones de otros triterpenoides, así como también para otras dos sapogeninas triterpénicas se propuso rutas de fragmentación con el fin de lograr una adecuada identificación de compuestos triterpénicos presentes en Pol-4.



De acuerdo al cromatograma CLAE-UV obtenido a 201 nm de Pol-4, son tres las saponinas triterpénicas (previamente identificadas en el quillay por Cartagena, 2010) que se encuentran en la muestra: pico 2: ácido 22- hidroxiquillaico, pico 4: ácido fitolacagénico, pico 5: ácido quillaico.



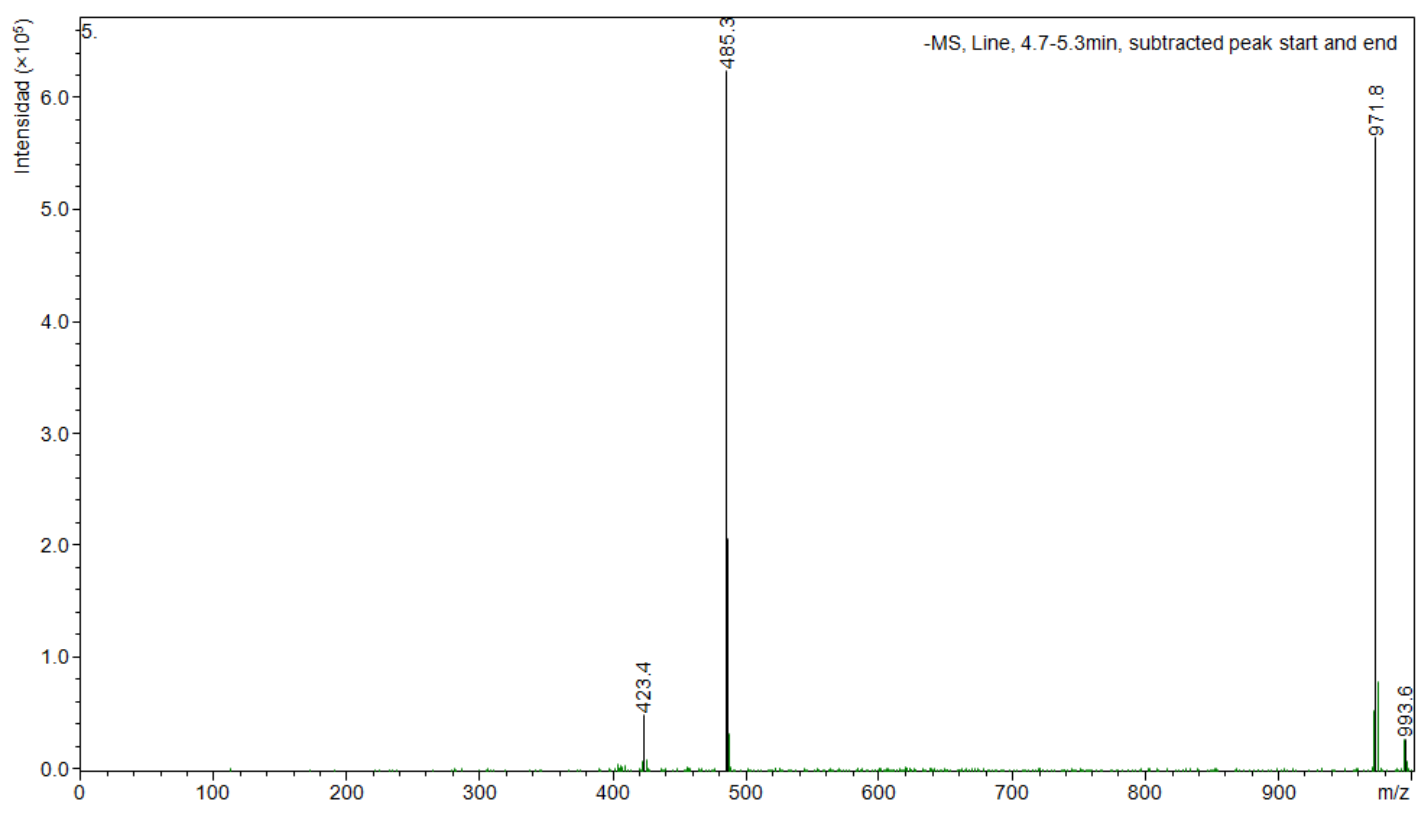
**Figura 4.** Cromatograma CLAE-UV obtenido a 201 nm de Pol-4. Pico 2 corresponde a ácido fitolacagénico, pico 4 a ácido 22-OH quillaico y pico 5 a ácido quillaico.

### 5.2.2. Ruta de fragmentación propuesta para el ácido quillaico

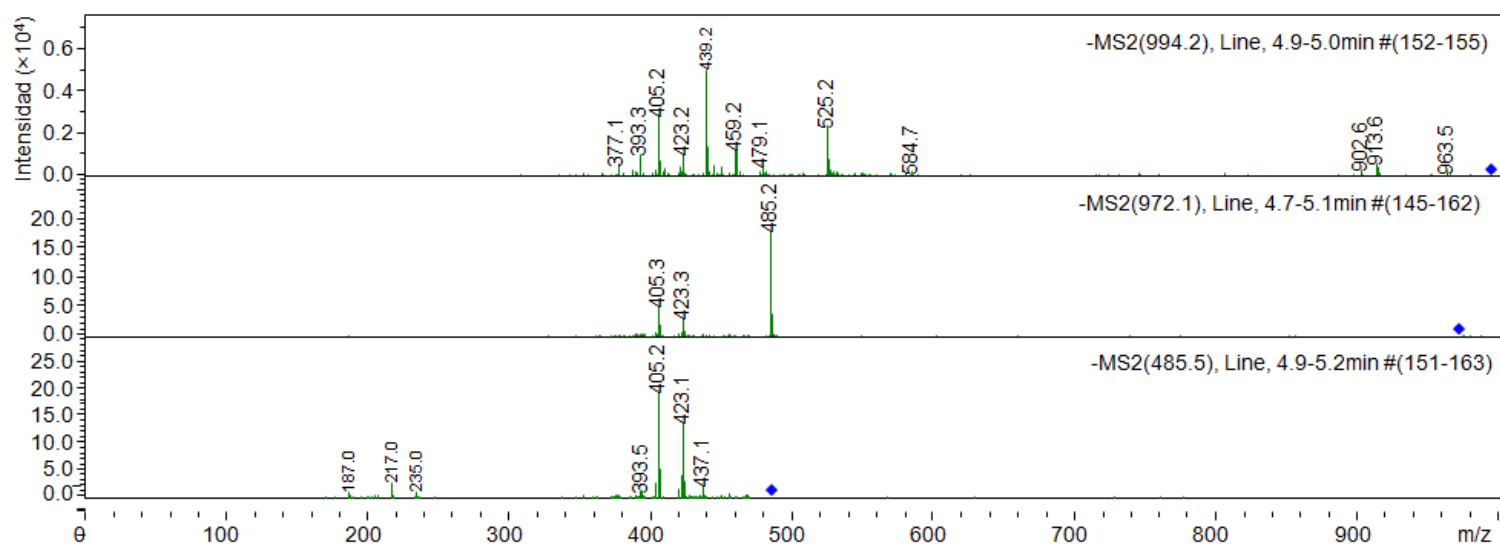
En el espectro de masas ( $EM^1$ ), primero se identificó la señal  $m/z$  principal que corresponde al ión pseudomolecular  $[M-H]^-$  485( $m/z$ ) del ácido quillaico, se observó además su dímero  $[2M-H]^-$  972 ( $m/z$ ) y el dímero sódico de la molécula  $[2M+Na-2H]^-$  994 ( $m/z$ ) (Figura 5).

En el  $EM^2$  de los iones nombrados con anterioridad, se identificaron fragmentos iguales para cada ión, lo que significa que estos iones provienen de un mismo compuesto (Figura 6). A continuación se propusieron rutas de fragmentación para el AQ. Una fue fragmentación general de la molécula y otra la fragmentación del núcleo formado por la reacción de retro Diels Alder (Figura 7. a y b

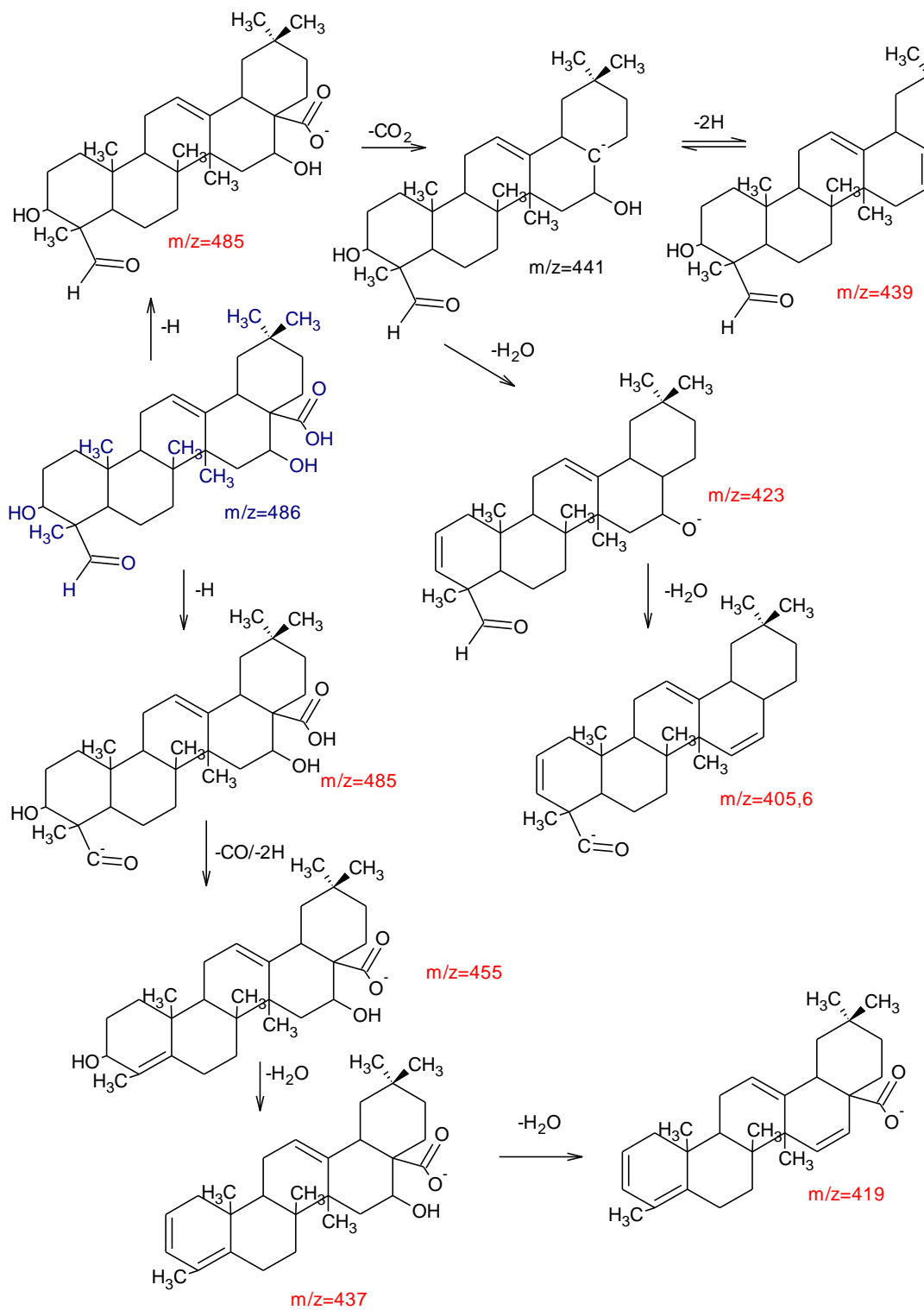
respectivamente). Los principales fragmentos del ácido quillaico fueron: 455 (m/z) por  $[M-H-CO-2H]^-$ , 437(m/z) por  $[M-H-CO-2H-H_2O]^-$ , 423 (m/z)  $[M-H-CO_2-H_2O]^-$  y 405 (m/z) por  $[M-H-CO_2-2H_2O]^-$ .



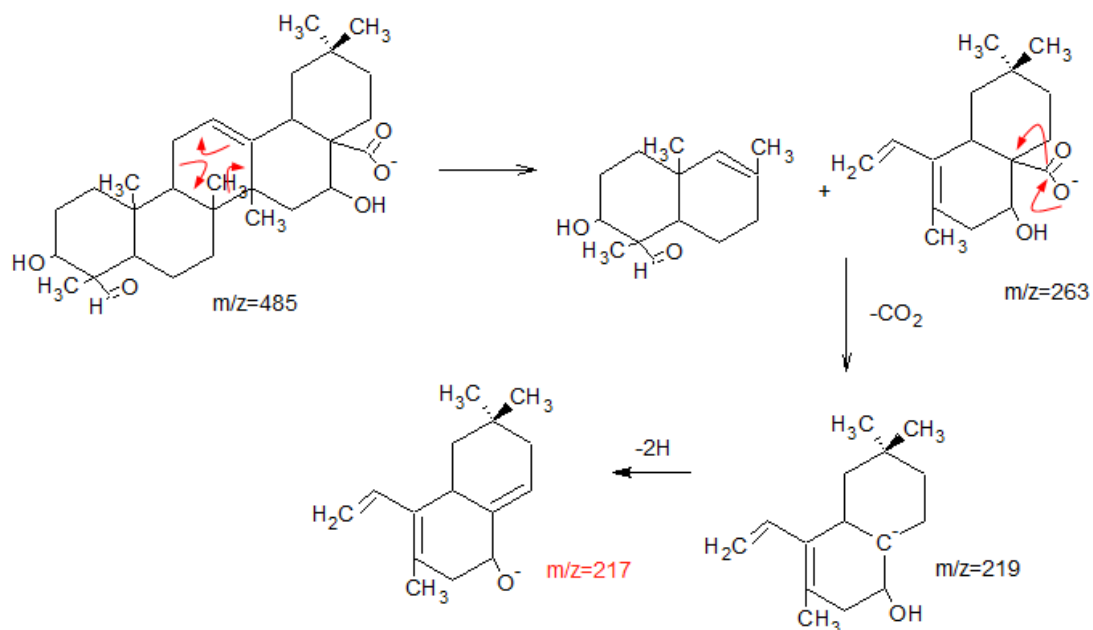
**Figura 5.** Espectro de masas (IES-EM<sup>1</sup>) obtenido para pico 5 (ácido quillaico)



**Figura 6.** Espectro de masas (IES-EM<sup>2</sup>) del ácido quillaico



**Figura 7 a.** Ruta de fragmentación propuesta para ácido quillaico



**Figura 7 b.** Ruta de fragmentación propuesta para el núcleo formado por retro Diels-Alder en el ácido quillaico

### 5.2.3. Ruta de fragmentación propuesta para el ácido fitolacagénico

Siguiendo con el análisis de los espectros, como se dijo anteriormente el pico 4 del cromatograma CLAE-UV corresponde al triterpenoide ácido fitolacagénico (ácido 3 $\beta$ , 23-dihidroxi-30-metilcarbonilolean-12-en-28-oico), de fórmula C<sub>31</sub>H<sub>48</sub>O<sub>6</sub> el cual tiene un PM de 516 g/mol, y por lo tanto su ión pseudomolecular [M-H]<sup>-</sup> es 515 m/z, el que se detectó instrumentalmente y se generó su EM<sup>1</sup> y EM<sup>2</sup>, ver Figura 8a y b respectivamente. En consecuencia se proponen dos rutas de fragmentación para las principales señales m/z observadas experimentalmente (Figura 9a y b).

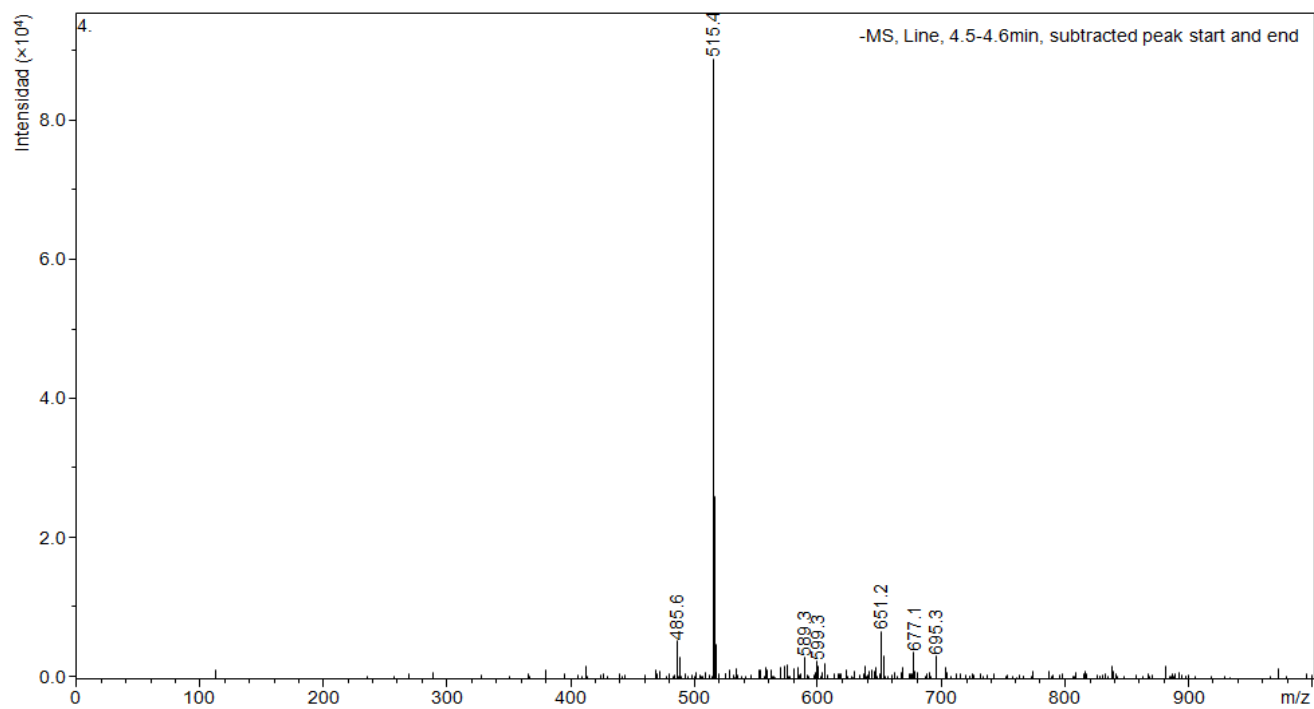
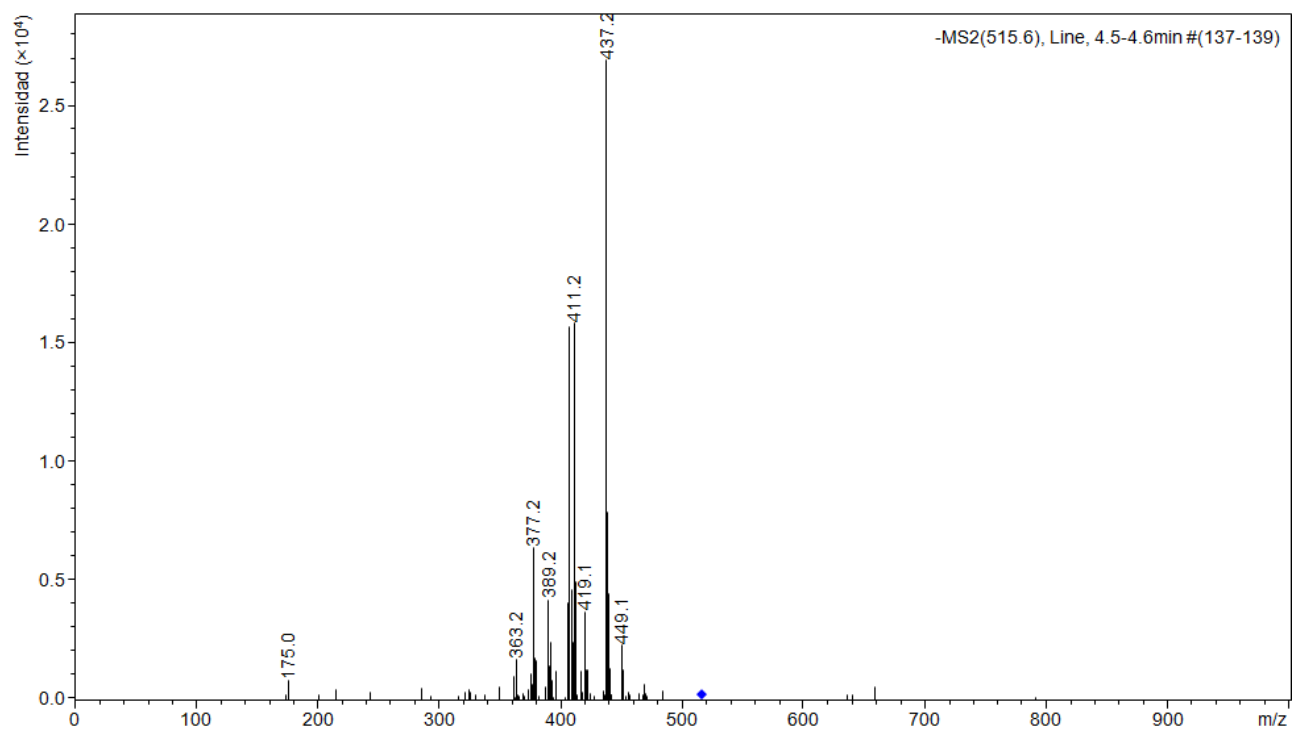
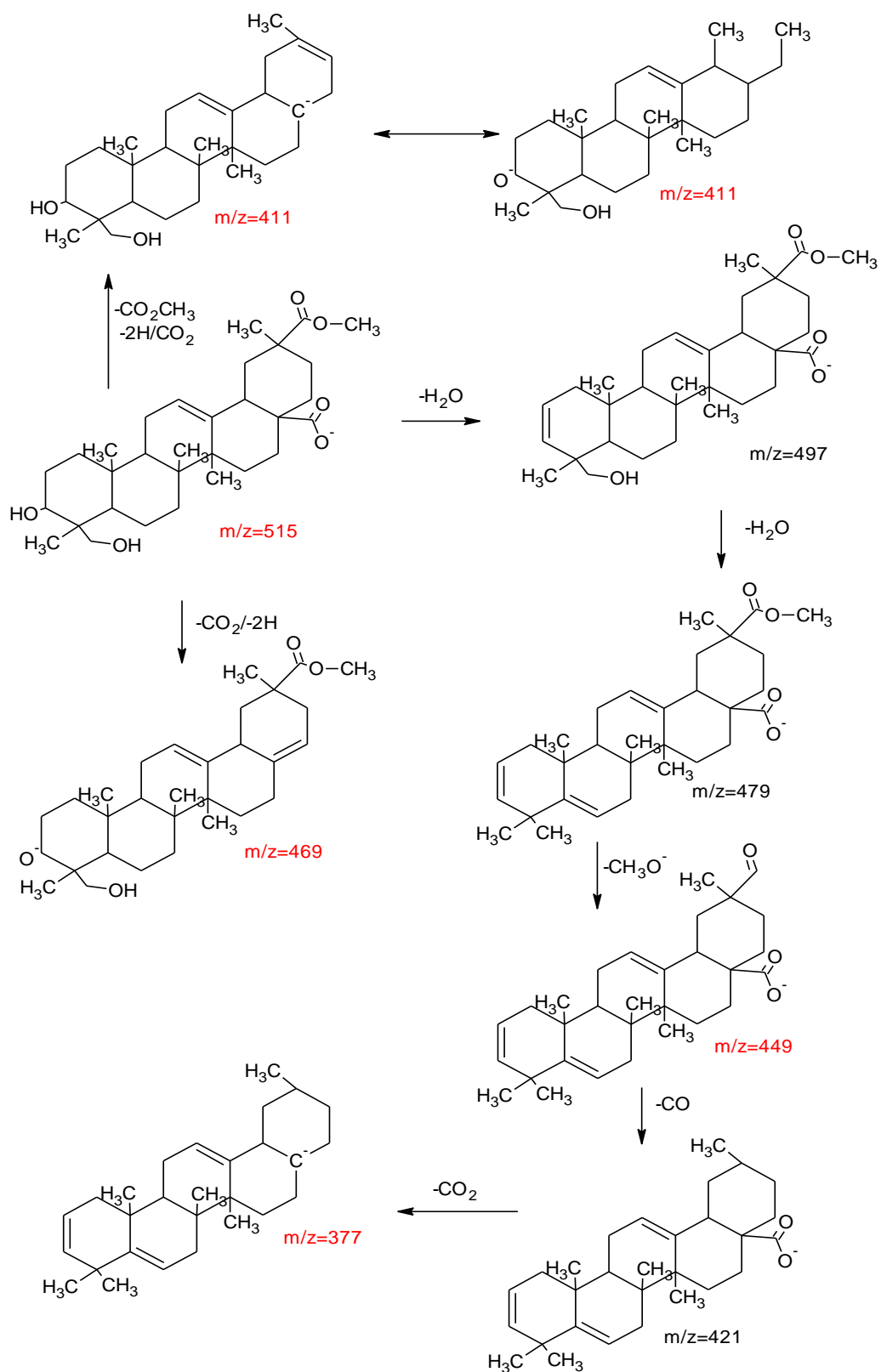


Figura 8a. Espectro EM<sup>1</sup> observado del pico 4 (ácido fitolacagénico)

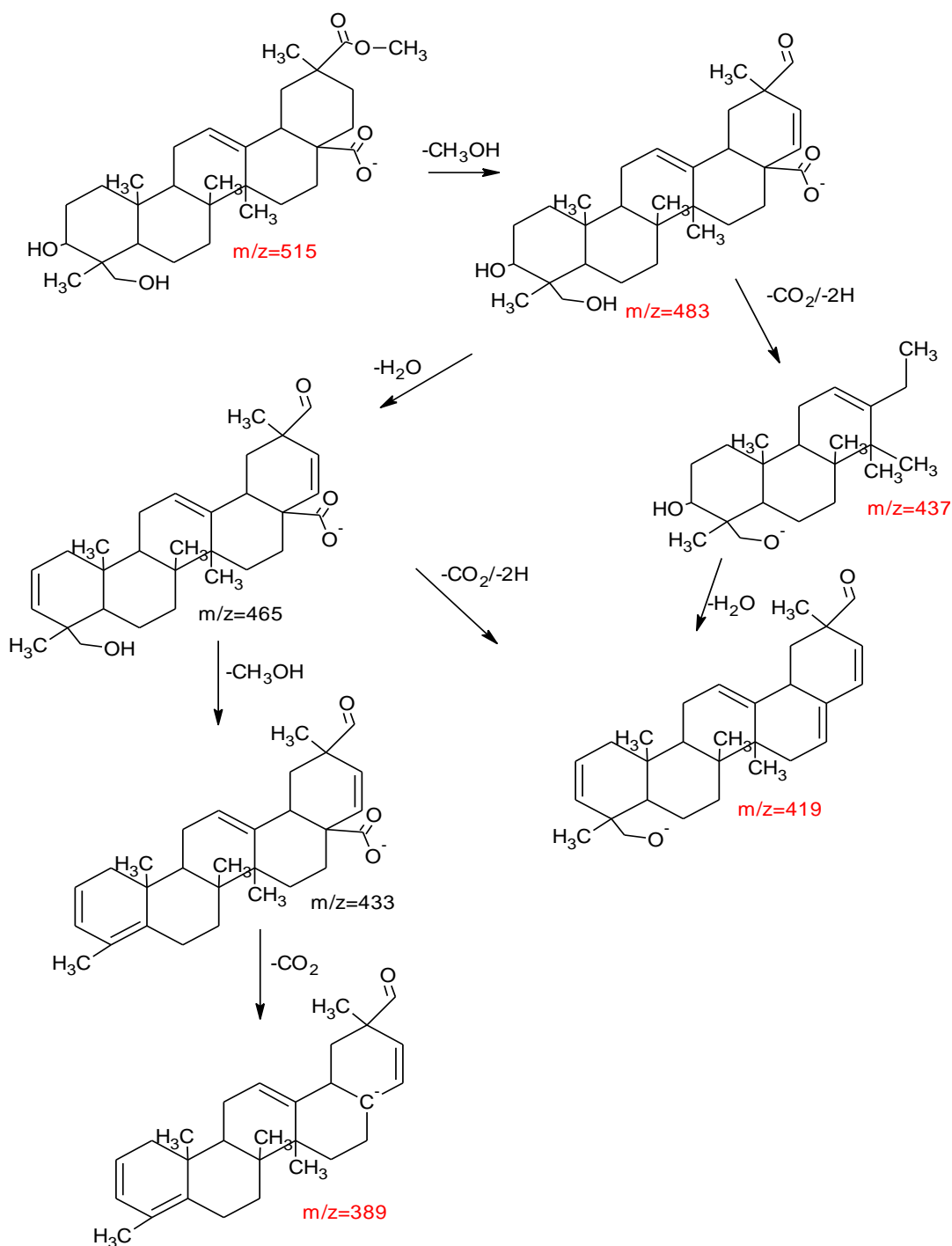


**Figura 8b.** Espectro  $EM^2$  observado del pico 4 (ácido fitolacagénico)



**Figura 9 a.** Primera ruta de fragmentación propuesta para el ácido fitolacagénico



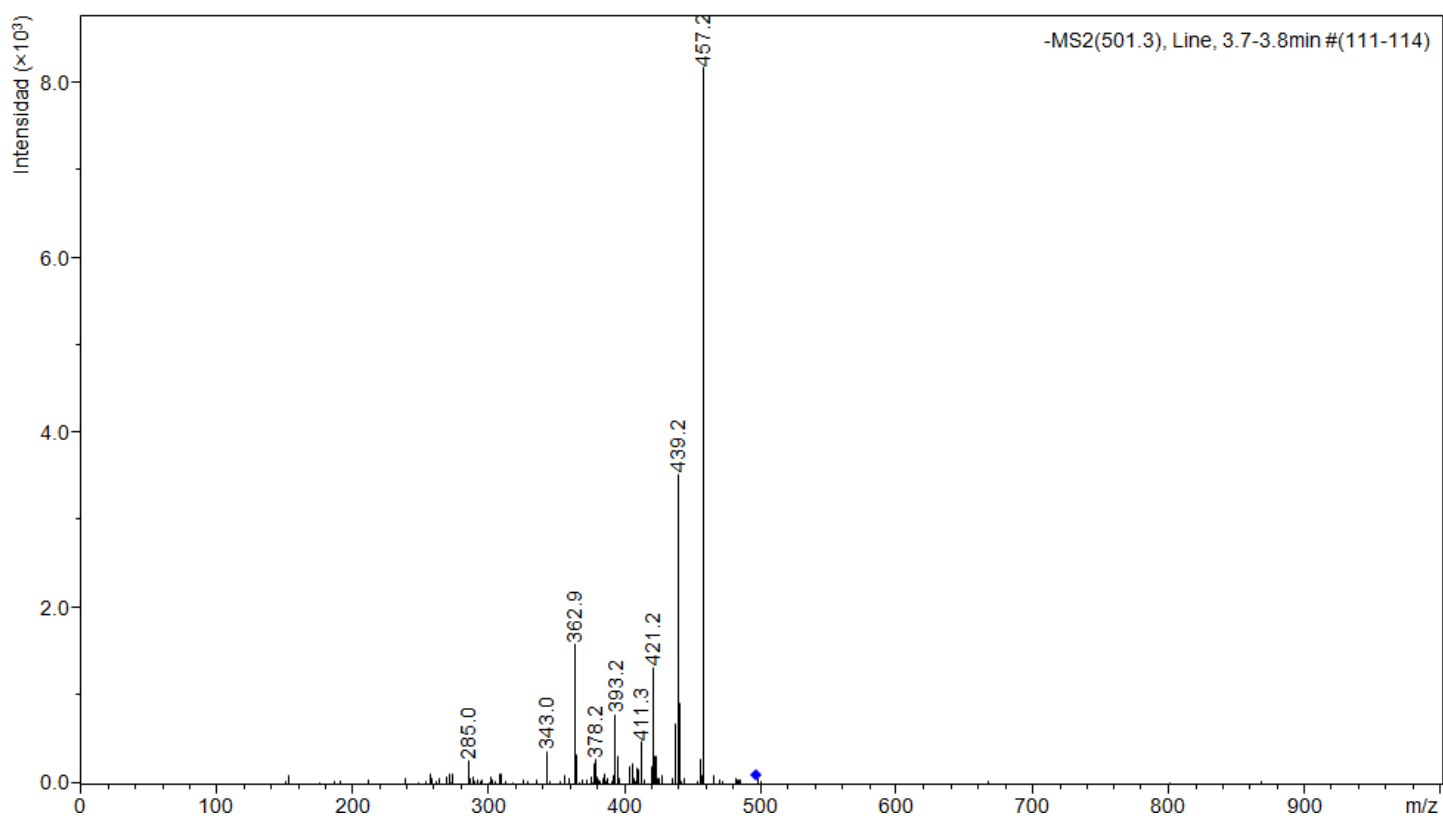


**Figura 9 b.** Segunda ruta de fragmentación propuesta para el ácido fitolacagénico

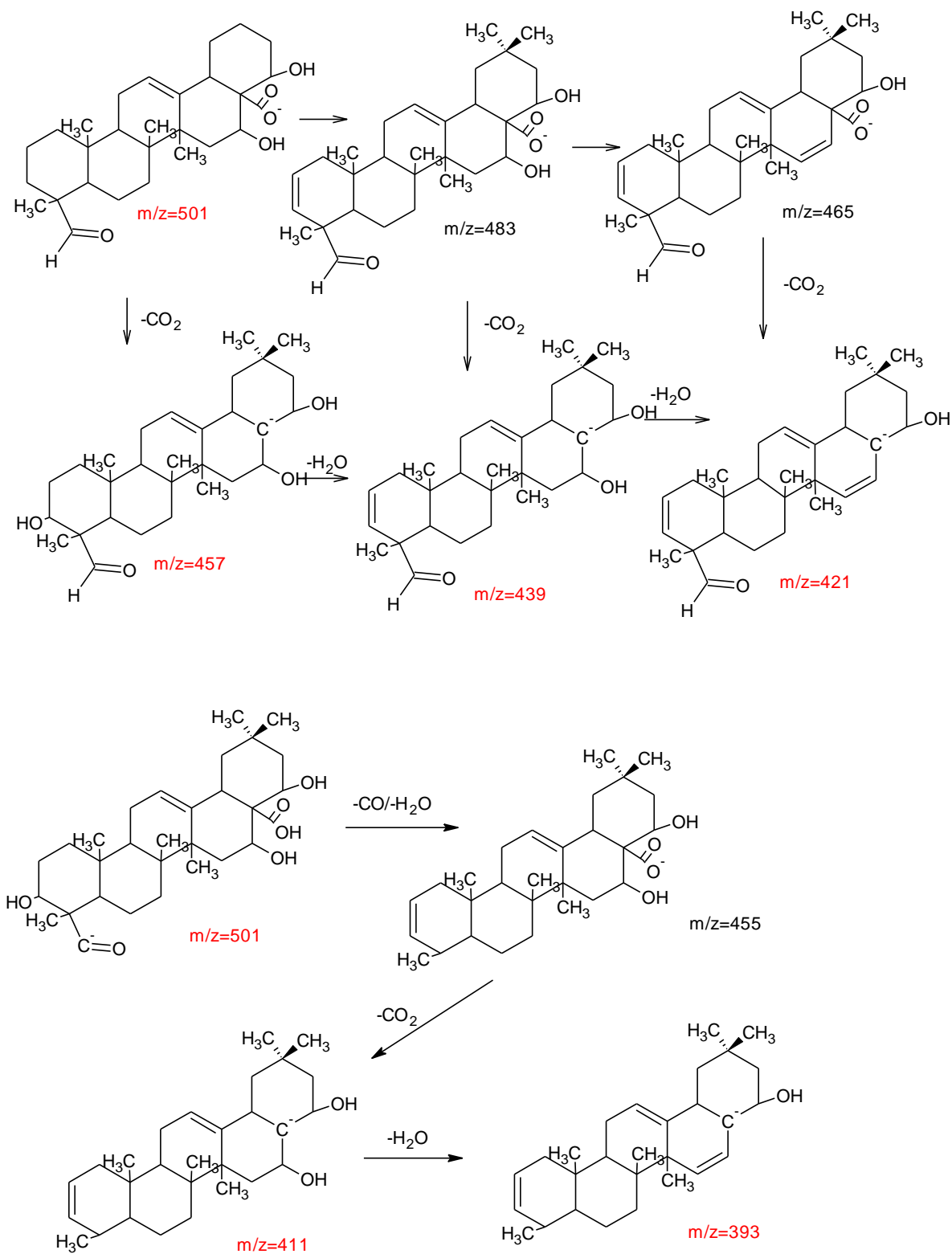
#### 5.2.4. Ruta de fragmentación propuesta del ácido 22-Hidroxi-quillaico

El último compuesto identificado en el cromatograma CLAE-UV correspondiente al pico 2, fue el ácido 22-hidroxiquillaico, de fórmula  $\text{C}_{30}\text{H}_{46}\text{O}_6$ , peso molecular 502 g/mol, se identificó por su ión

pseudomolecular 501 m/z. Luego en función de la fragmentación de m/z 501 (Figura 10) se propuso una ruta de fragmentación, considerando los valores m/z más importantes (Figura 11).



**Figura 10.** Espectro EM<sup>2</sup> obtenido para m/z 501 en pico 2 (ácido 22-hidroxi-quillaico)



**Figura 11.** Ruta de fragmentación propuesta del ácido 22-OH quillaico

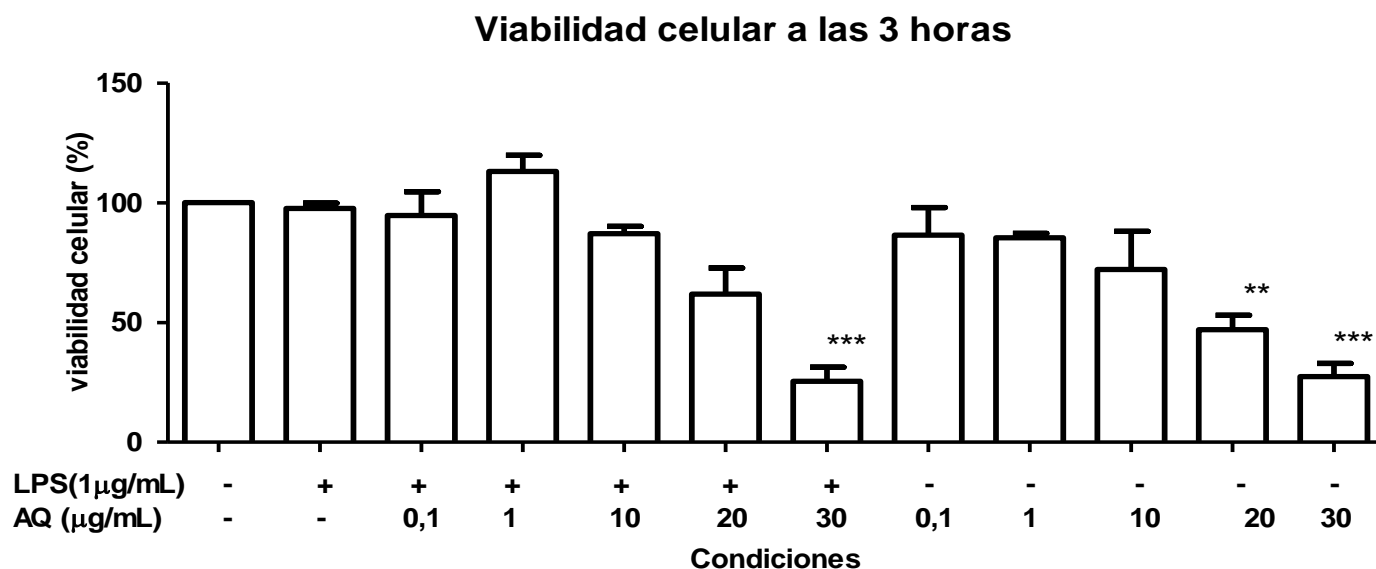
### 5.3. Ensayos en línea celular RAW 264.7

#### 5.3.1. Ensayos de viabilidad

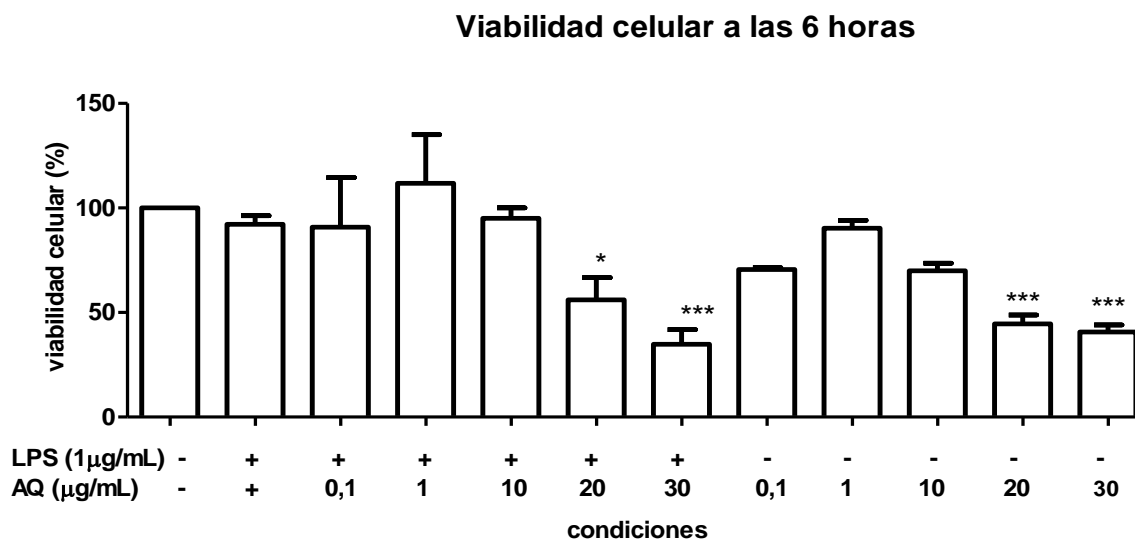
Se realizaron ensayos de viabilidad a las 3, 6 y 24 h y distintos controles para descartar muerte por solvente o reactivos: control en presencia de DMSO 0,003% y LPS 1  $\mu\text{g/mL}$ , En estos controles la viabilidad celular fue del 100%, lo que permitió descartar la muerte celular por estos reactivos en las muestras que poseen AQ.

A todos los tiempos ensayados se observó entre un 50–80% de muerte celular a las concentraciones de 20  $\mu\text{g/mL}$  y 30  $\mu\text{g/mL}$  de AQ en presencia y ausencia de LPS (Figura 12a, b y c), siendo esta diferencia significativa respecto al control ( $p < 0,05$ ), por lo que se descartaron para los estudios de la evaluación de la expresión de COX-2. Se procedió a trabajar con las concentraciones de 0,1  $\mu\text{g/mL}$ , 1  $\mu\text{g/mL}$  y 10  $\mu\text{g/mL}$  de AQ con 24 horas de incubación en ausencia y presencia de LPS.

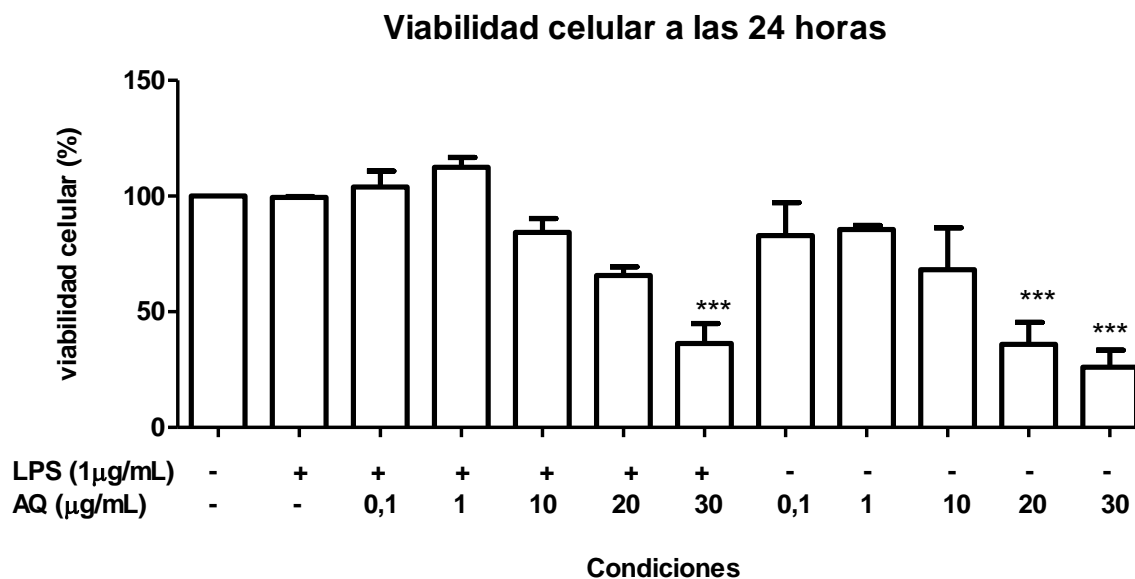
a.



b.



c.

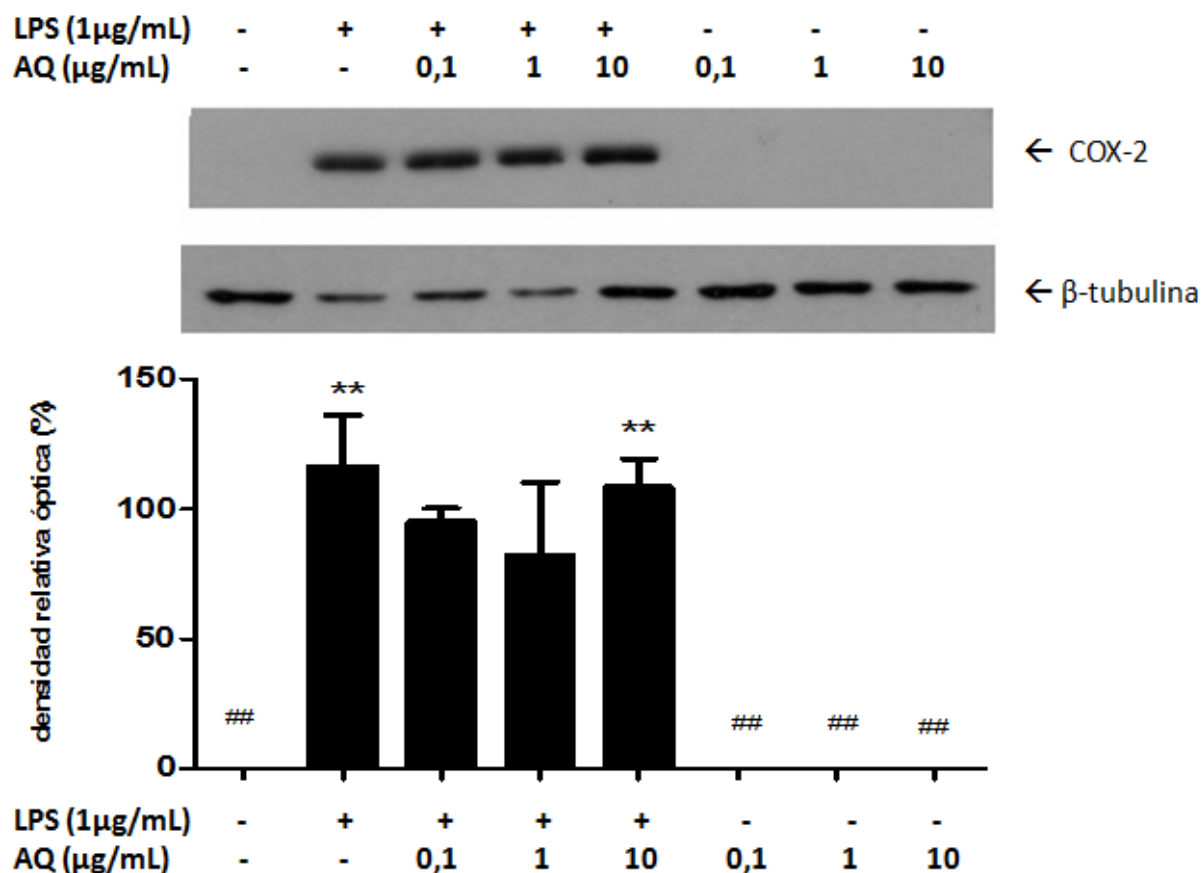


**Figura 12. Efecto de AQ sobre la viabilidad de las células RAW 264.7.** Las células fueron tratadas con 0; 0,1; 1; 10; 20 y 30 µg/mL de AQ en presencia y ausencia de LPS (1 µg/mL) por 3, 6 y 24 h (Figuras a, b y c respectivamente). Los datos se expresaron como el promedio  $\pm$  SEM de al menos cuatro experimentos independientes. \*\*\* indica diferencia estadísticamente significativa comparados con las células no tratadas con LPS y AQ. ( $P < 0,05$ )

### 5.3.2. Efecto de AQ sobre la expresión de COX-2

Antecedentes del laboratorio indican que el AQ tiene efectos antiinflamatorios *in vivo* Rodríguez-Díaz y cols. (2011) y Arrau (2011). Con el fin de determinar un posible mecanismo por el cual el AQ podría producir efecto antiinflamatorio se evaluó la acción de AQ (0,1-10  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) sobre la expresión de la proteína COX-2 en una línea celular de macrófagos derivados de ratón (células RAW 264.7) en presencia y ausencia de LPS. Los resultados mostrados en la **Figura 13** indican una tendencia a la disminución de la expresión de COX-2 a todas las concentraciones de AQ utilizadas con respecto a las células tratadas con LPS.

Utilizando AQ a 1  $\mu\text{g}/\text{mL}$  se obtuvo un mayor porcentaje de disminución de la expresión de COX-2, siendo este un 34,4 %, luego lo sigue 0,1  $\mu\text{g}/\text{mL}$  con el 21,3 % de diferencia y finalmente 10  $\mu\text{g}/\text{mL}$  de AQ con un 7,9%. Sin embargo, ninguna de las concentraciones tratadas tiene una diferencia estadísticamente significativa. En el caso de las células que no fueron tratadas con LPS no hubo expresión de COX-2.



**Figura 13. Efecto de AQ sobre la expresión de la proteína COX-2 en las células RAW 264.7.** Las células fueron incubadas con 0; 0,1 y 10 µg/mL de AQ en presencia y ausencia de LPS (1 µg/mL) por 24h. Luego, para detectar la proteína COX-2 se realizó un inmunowestern blot con 40 µg de proteína de cada una de las muestras y se utilizó β-tubulina como control de carga. En el panel superior se muestra una fotografía representativa de la expresión de COX-2 y en el gráfico el porcentaje de expresión de COX-2 en relación al control. Los resultados se expresan como el promedio ± SEM de al menos cuatro experimentos independientes. ## Indica diferencia estadísticamente significativa con respecto a las células tratadas con LPS ( $P < 0,05$ ) y \*\* indica diferencia estadísticamente significativa con respecto a las células no tratadas ( $P < 0,05$ ).

### 5.3.3. Cuantificación de nitrito en el medio de cultivo

Como indicador de estrés oxidativo por efecto de LPS (1 µg/mL), se cuantificó nitrito acumulado en el medio de cultivo de las células estimuladas por 24h en ausencia y presencia de LPS y en ausencia y presencia de AQ a las tres concentraciones estudiadas. En la **Tabla 3** se observa que no existe diferencia significativa entre la cantidad de nitrito de la muestra que tiene LPS con respecto a las

muestras que tienen AQ (0,1; 1; 10  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) más LPS. En las células tratadas sólo con AQ, la concentración de nitrito se mantuvo a niveles similares a la de las células sin ningún tipo de estímulo.

**Tabla 3. Cuantificación de nitrito.** Las células RAW 264.7 fueron incubadas con AQ (0,1; 1 y 10  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) en presencia y ausencia de LPS (1  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) por 24h. Los resultados están expresados como el promedio  $\pm$  SEM de al menos cuatro experimentos independientes.

	Nitrito ( $\mu\text{M}$ )
	24h
Control ( C )	1,2 $\pm$ 0,1
C + 0,1 $\mu\text{g}/\text{mL}$	1,6 $\pm$ 0,1
C + 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$	0,7 $\pm$ 0,1
C + 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$	0,4 $\pm$ 0,1
LPS	1,5 $\pm$ 0,2
LPS + 0,1 $\mu\text{g}/\text{mL}$	1,6 $\pm$ 0,4
LPS + 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$	1,3 $\pm$ 0,2
LPS + 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$	0,8 $\pm$ 0,2



## VI. DISCUSIÓN

El presente estudio fue realizado para complementar el conocimiento existente tanto de la información química como farmacológica del quillay. Por lo tanto, se dividió en dos secciones, en la primera se llevó a cabo la determinación de sapogeninas que están presentes en una fracción de mediana polaridad del H-100Q obtenido de un extracto rico en saponinas de la biomasa del quillay por la técnica analítica CLAE-UV-IES-EM y, la segunda, tuvo por objetivo elucidar un posible mecanismo de acción farmacológica de la sapogenina mayoritaria presente en la fracción trabajada anteriormente en la línea celular RAW 264.7.

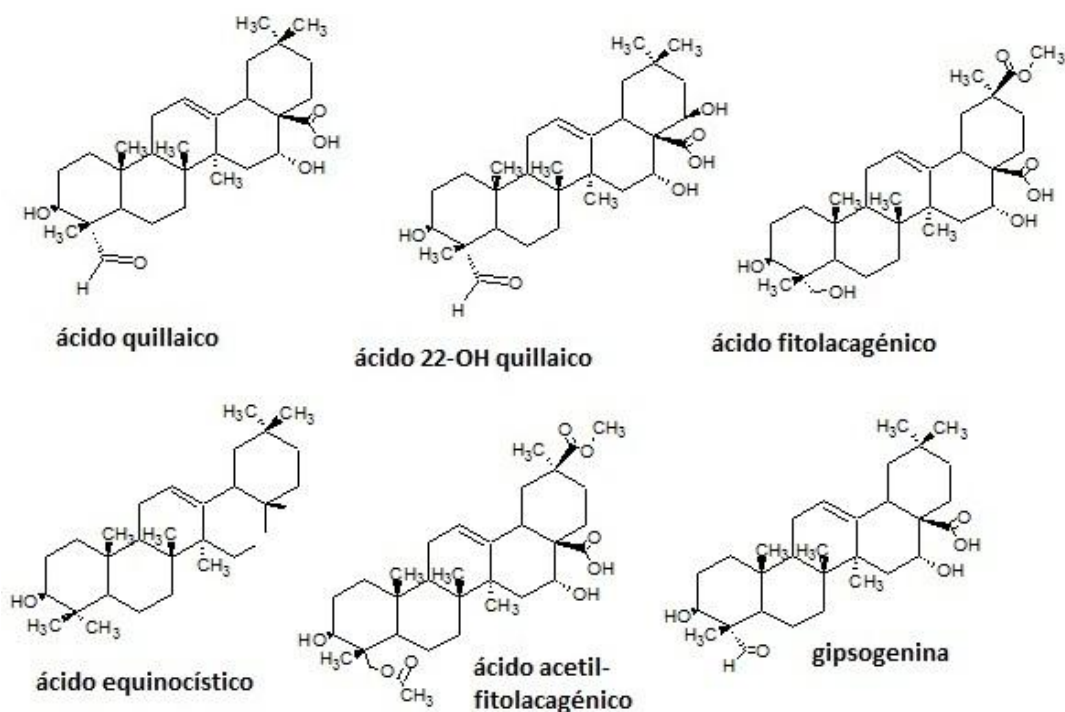
### 6.1. Parte química

El rendimiento del H-100Q aumentó en aproximadamente en un 10% al utilizar una solución acuosa con HCl al 18 % y con un menor tiempo de calentamiento a reflujo respecto a lo descrito por Rodríguez-Díaz y cols. (2011) quienes utilizaron HCl al 9 %.

Luego de realizados los lavados al producto de hidrólisis (H-100Q) con la solución básica de NaOH (0,05 M), disminuyó la cantidad de compuestos fenólicos procedentes del extracto acuoso Ultra Dry 100 Q. Este procedimiento fue monitoreado por CCF y revelado con NP/PEG al UV, donde se corroboró la disminución de la fluorescencia de estos compuestos observando con luz UV a 366nm.

El ácido quillaico, ácido fitolacagénico y el ácido 22-OH quillaico son parte de las principales sapogeninas que ya han sido descritas en la literatura, las cuales se encuentran en la biomasa del quillay (Bankefors y cols., 2010; Kite y cols., 2004; Cartagena, 2010).

Cabe destacar que estas sapogeninas fueron identificadas y aisladas por Cartagena (2010); Rodríguez-Díaz y cols. (2011) y Arrau, (2011) en el laboratorio de productos naturales. Como se muestra en la Figura 14 son seis los principales triterpenoides presentes en la biomasa del quillay.



**Figura 14.** Triterpenoides presentes en el quillay

Debido a la escasa literatura sobre las fragmentaciones de las sapogeninas triterpénicas, se propusieron rutas de fragmentación molecular para los compuestos identificados, con la finalidad de facilitar a una futura investigación a identificar compuestos presentes en una muestra que posee triterpenoides.

La identificación de dichos compuestos se realizó utilizando un CLAE-UV-IES-EM<sup>n</sup>, del cual se pudo determinar que la sapogenina principal presente en Pol-4 es el ácido quillaico, así como también se obtuvieron los espectros con fragmentos característicos para cada compuesto de la muestra, basándose en primera instancia en el ión pseudomolecular. Además, para el ácido quillaico y ácido fitolacagénico, se disponía de los patrones secundarios que anteriormente fueron identificados por H<sup>1</sup>RMN y aislados por Cartagena (2010), por lo que se pudo realizar la fragmentación de dichos patrones y comparar señales m/z de los compuestos de interés.

Las rutas de fragmentación molecular se realizaron para las principales señales m/z de los espectros de masa. En el caso del AQ se propuso la fragmentación del núcleo formada por la reacción de retro Diels Alder debido a la presencia de señales m/z presentes en su espectro.

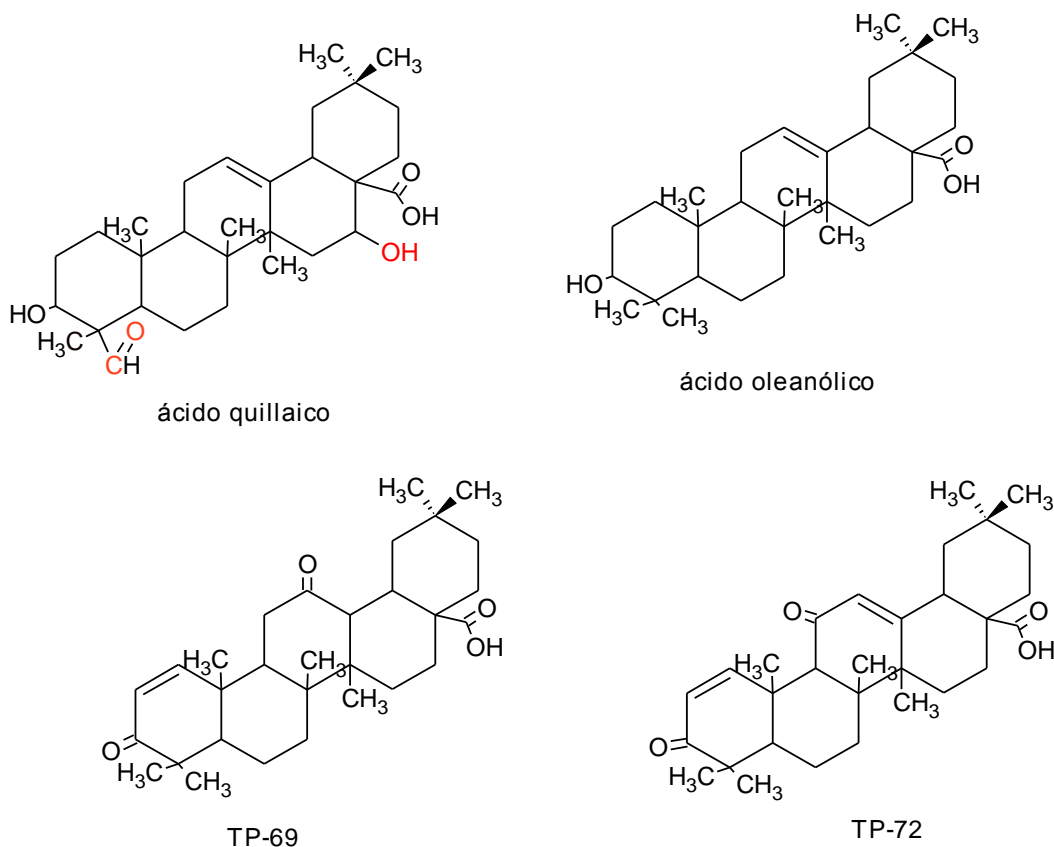
De acuerdo a las rutas propuestas se espera que en primera instancia se pierden los grupos nucleofílicos como  $-\text{CO}_2$  y  $-\text{OH}$ , este último se pierde principalmente como  $\text{H}_2\text{O}$ , seguido por grupos carbonilos ( $-\text{CO}$ ), metoxi ( $-\text{OCH}_3$ ) y protones.

## 6.2. Parte farmacológica

Tal como fue señalado anteriormente, el ácido quillaico que es la sapogenina mayoritaria de Pol-4, presentó actividad antiinflamatoria y antinociceptiva *in vivo*. Dichos estudios realizados por el grupo de productos naturales de la Facultad, nos llevaron a plantear la hipótesis de esta memoria que señala que un posible mecanismo de acción antiinflamatorio del AQ es la inhibición de la expresión de la enzima proinflamatoria COX-2.

Los resultados demostraron que no hubo diferencias significativas al pre incubar AQ en las distintas concentraciones más LPS comparadas con su control, por lo que el mecanismo de acción antiinflamatorio no sería a través de la modulación de la expresión de la COX-2. Sin embargo, sí hubo una tendencia a la disminución de la expresión de esta enzima por efecto del AQ y, debido a la dispersión de los datos, se propone realizar repeticiones de los nuevos ensayos considerando: a) controlar más eficazmente la velocidad de proliferación del cultivo celular, pues la alta variabilidad obtenida puede ser atribuida a que en cada experimento independiente las células se encontraban en un diferente estado del ciclo celular al comenzar los estímulos con AQ y/o LPS, y b) pre incubar con AQ tiempos más largos antes de comenzar el estímulo con LPS.

Como se observa en la Figura 15, dentro de los triterpenoides pentacíclicos del grupo de los oleananos inhibidores de la expresión de COX-2 encontramos en la literatura al ácido oleanólico y derivados sintéticos del oleanano como el ácido 3,12-dioxoolean-1-en-28-oic (TP-69) y ácido 3,11-dioxoolean-1,12-dien-28-oic (TP-62) (Suh y cols., 1998). De acuerdo a la diferencia estructural que existe entre el ácido quillaico y estos derivados del oleanano podría influir por la relación estructura actividad, debido que el AQ posee un grupo aldehído en el C4 y el hidroxilo del C16 a diferencia de los otros triterpenos estudiados en otras investigaciones.



**Figura 15.** Estructura del ácido quillaico, ácido oleanólico, y dos derivados sintéticos

Nuestros resultados indicaron que LPS induce la expresión de COX-2 comparado con células sin estimular, tal como se mostró en la imagen del western blot representativo en la Figura 13.

Con fines comparativos, es importante señalar que en los ensayos que se realizarán en esta línea celular, se debería incluir un control positivo. Para comparar el efecto antiinflamatorio del triterpenoide en estudio proponemos realizar los futuros estudios con un control positivo. Como ejemplo de antiinflamatorios con dicho mecanismo de acción, encontramos en la literatura algunos análogos sintéticos de triterpenoides pentacíclicos como TP-72, TP-69, CDDO, (Suh y cols., 1998; Suh y cols, 2007) y fármacos de referencia como dexametasona (Suh y cols., 1998). Del mismo modo se propone comparar el efecto del ácido quillaico respecto a un fármaco de referencia de reconocida acción inhibitoria sobre la actividad de la iNOS como por ejemplo L-NIL, TP-72, TP-69.

En los resultados para la medición de nitritos no se observó diferencia significativa con respecto a las células tratadas en presencia y ausencia de LPS, lo que significa que el AQ no inhibe la liberación de nitrito en estos ensayos. Para complementar estos resultados, se sugiere además realizar la misma metodología de inmunowestern blot para la iNOS y así atribuir o no estos resultados a una posible modulación del AQ sobre la expresión de la proteína y por tanto a la actividad de esta enzima.

## VII. CONCLUSIÓN

Se logró optimizar el rendimiento y la purificación de H-100Q con HCl al 18% en un menor tiempo (de 30% a un  $40,4 \pm 2,0$  %) respecto a la cantidad inicial del extracto acuoso de quillay, seguido por dos lavados de solución básica.

Se determinó la presencia de ácido quillaico, ácido fitolacagénico y ácido hidroxiquillaico en Pol-4 (fracción de polaridad media alta del H-100Q) mediante CLAE-UV-IES-EM.

El ácido quillaico es la sapogenina principal de Pol-4 al ser el pico mayoritario del cromatograma de CLAE-DAD.

Se proponen rutas de fragmentación molecular para las tres sapogeninas identificadas en función de los espectros  $EM^1$  y  $EM^2$  experimentales y algunos datos de literatura. Para el ácido quillaico además se propone una fragmentación del núcleo formada por la reacción de retro Diels Alder.

Se montó y estandarizó la técnica de inmunowestern blot sobre la línea celular RAW 264.7 para el ácido quillaico.

Se evaluó la inhibición de la expresión de la COX-2 por el ácido quillaico resultando en el estudio preliminar que no hay una disminución de la expresión de esta enzima. Además ácido quillaico no disminuyó la producción de nitritos.

**VIII. REFERENCIAS**

An H.J., Kim I.T., Park H.J., Kim H.M., Choi J.H., Lee K.L. Tormentic acid, a triterpenoid saponin, isolated from *Rosa rugosa*, inhibited LPS-induced iNOS, COX-2, and TNF- $\alpha$  expression through inactivation of the nuclear factor- $\kappa$ b pathway in RAW 264.7 macrophages. *International Immunopharmacology*. (11): 504-510, 2011.

Arrau S., Delporte C., Cartagena C., Rodríguez-Díaz M., González P., Silva X., Cassel B.K., Miranda H.F. Antinociceptive activity of *Quillaja saponaria* Mol. saponin extract, quillaic acid and derivatives in mice. *Journal of ethnopharmacology*. 133:164–167, 2011.

Bankefors Johan, Nord L.I., Kenne L. Multidimensional profiling of components in complex mixtures of natural products for metabolic analysis, proof of concept: Application to Quillaja saponins. *Journal of Chromatography B*. 878:471–476, 2010.

Bomford R., Stapleton M., Winsor, S., Beesley, J.E., Jessup, E.A., Price, K.R. & Fenwick, G.R. Adjuvanticity and iscom formation by structurally diverse saponins. *Vaccine* 10: 572–577, 1992.

Cartagena C, Sapogeninas de un extracto de corteza de *Quillaja saponaria* Mol., aislamiento, identificación y evaluación de potencial actividad hipoglicemiante *in-vitro*. Memoria de título, Santiago, Chile. Universidad de Chile. Facultad de Cs. Químicas y Farmacéuticas, 2010, 84h.

Chang CT., Huang SS., Lin SS., Amagaya S., Ho H., Hou WC., Shie Ph., Wu JB., Huang GJ. Anti-inflammatory activities of tormentic acid from suspension cells of *Eriobotrya japonica* *ex in vivo* and *in vivo*. *Food Chemistry*. 127: 1131-1137.

Chile Flora. *Quillaja saponaria* (quillay) [en línea]

<http://www.chileflora.com/Florachilena/FloraSpanish/SHSearchengine.htm> [consulta: 06 mayo 2012]

Güçlü-Üstündağ Özlem, Mazza Giuseppe. Saponins: Properties, Applications and Processing. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 47:231–258 (2007)

Gupta Mahabir P. Plantas medicinales iberoamericanas. República de Panamá; CYTED, Organización del convenio Andrés Bello, 2008, 783p.

Hostettmann K. y Marston A. Chemistry and pharmacology of natural products, Saponins. Cambridge, Cambridge University Press: 3-21,1995.

- Hseu YC., Wu FY., Wu JJ., Chen JY., Chang WH., Lu FJ, Lai Yu-Ching, Yang HL. Anti-inflammatory potential of *Anrodia camphorata* through inhibition of iNOS, COX-2 and cytokines via the NF- $\kappa$ B pathway. *International Immunopharmacology*. (5): 1914-1925, 2005.
- Kensil CR., Patel U., Lennick M., Marciani D. Separation and characterization of saponins with adjuvant activity from *Quillaja saponaria* molina cortex. *The journal of immunology*. 146(2): 431-437, 1991.
- Kite GC, Howes MJ, Simmonds MS. Metabolomic analysis of saponins in crude extracts of *Quillaja saponaria* by liquid chromatography/mass spectrometry for product authentication. *Rapid Commun Mass Spectrom*. 23(18):2859-70, 2004.
- Oleszek W, Bialy Z. Chromatographic determination of plant saponins—An update (2002–2005). *Journal of Chromatography A*, 1112: 78–91, 2006.
- Orellana A. Efecto de Murtilla (*Ungui molinae*) en células tumorales y frente a 15- lipoxigenasa. Memoria de título. Santiago, Chile. Universidad de Chile. Facultad de Ciencias químicas y farmacéuticas. 50h.
- Park YM., Kim IT., Park HJ., Choi JW., Park KW., Lee JD, Nam BH., Kim DG, Lee JY. and Lee KT. Anti-inflammatory and anti-nociceptive effects of the methanol extract of *Fomes fomentarius*. *Biological Pharmaceutical Bulletin*. 27(10): 1588-1593, 2004.
- Pham HL., Ross BP., McGeary RP., Shaw PN., Hewavitharana KA., Davies MN. Saponins from *Quillaja saponaria* Molina: Isolation, characterization and ability to form immuno stimulatory complexes (ISCOMs), *Current drug delivery*. 3: 389-391, 2006
- Pokharel YR., Yang JW., Kim JY., Oh HW., Jeong HG., Woo ER., Kang KW. Potent inhibition of the inductions of inducible nitric oxide synthase and cyclooxygenase-2 by taiwaniaflavone. *Nitric Oxide*. 2006.
- Resnik S., Quillaja saponaria extracts, Chemical and technical assessment. *Joint FAO/WHO expert committee on food additives*, 61st, 2004. 1-9h.
- Ringbom T., Segura L., Noreen Y., Perera P., and Bohlin L. Ursolic acid from *Plantago major*, a selective inhibitor of Cyclooxygenase-2 catalyzed prostaglandin biosynthesis. *Journal of natural products*., 61: 1212-1215,1998.



Rodríguez-Díaz M., Delporte C., Cartagena C., Cassels B.K., González P., Silva X., León F. and Wessjohann L. A. Topical anti-inflammatory activity of quillaic acid from *Quillaja saponaria* Mol. and some derivatives. *Journal of pharmacy and pharmacology*. 63: 718-724, 2011.

San Martín R y Magunacelaya J.C. Control of plant-parasitic nematodes with extracts of *Quillaja saponaria*. *Nematology*. 7(4):577-585, 2005.

San Martín R., Briones R. Industrial uses and sustainable supply of *Quillaja saponaria* (Rosaceae) Saponins. *Economic Botany*, 53 (3): 302-311, 1999.

Suh Nanjoo, Honda Tadashi, Finlay Heather J., Barchowsky Aaron, Williams Charlotte, Benoit Nicole E., Xie Qiao-wen, Nathan Carl, Gribble Gordon W., and Sporn Michael B. Novel triterpenoids suppress inducible Nitric Oxide Synthase (iNOS) and inducible Cyclooxygenase (COX-2) in Mouse Macrophages. *Cancer research*. (58): 717-723, 1998.

Suh SJ., Jin UH., Kim KW., Son JK, Lee SH., Son KH., Chang HW., Lee YC., Kim CH. Triterpenoid saponin, oleanolic acid 3-O- $\beta$ -D-glucopyranosyl (1 $\rightarrow$ 3)- $\alpha$ -L-rhamnopyranosyl(1 $\rightarrow$ 2)- $\alpha$ -L-arabinopyranoside (OA) from *Aralia elata* inhibits LPS-induced nitric oxide production by down-regulated NF- $\kappa$ B in raw 264.7 cells. *Archive of biochemistry and biophysics*. 467: 227-233, 2007.

Takada K., Nakane T., Masuda K., Ishii H. Ursolic acid and oleanolic acid, members of pentacyclic triterpenoid acids, suppress TNF- $\alpha$ -induced E-selectin expression by cultured umbilical vein endothelial cells. *Phytomedicine*. (17): 1114-1119, 2010.

Van Setten DC., Ten Hove GJ., Wiertz E., Kamerling JP., and Van de Werken G. Multiple-stage tandem mass spectrometry for structural characterization of saponins. *Analytical Chemistry*. 70(20): 4001-4004, 1998.

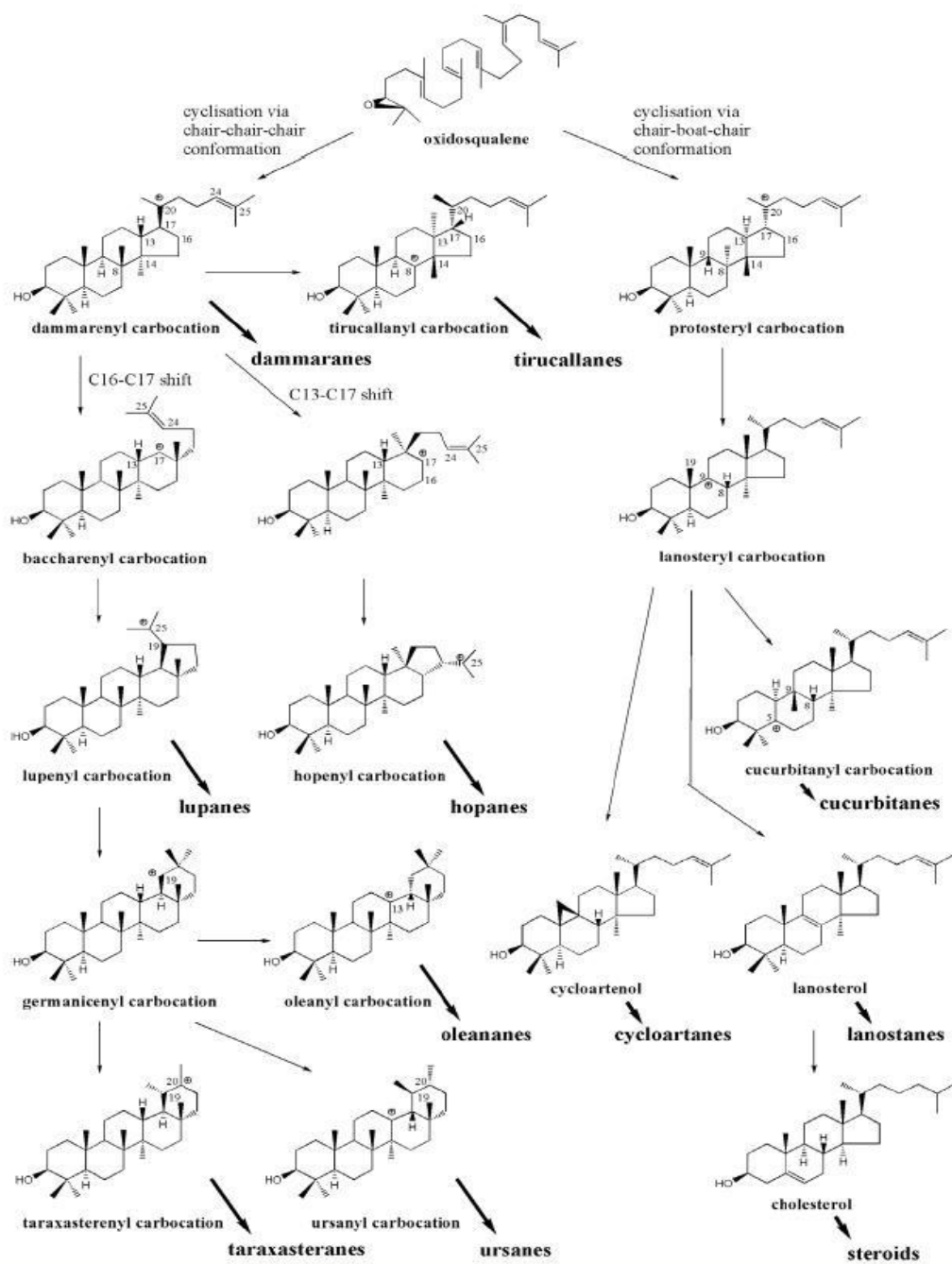
Viarural agro y construcción. Quillay (*Quillaja saponaria* Mol.) [ en línea]

<http://www.viarural.cl/agricultura/forestacion/especies/autoctonas/quillay/default.htm> [consulta: 06 mayo 2012]

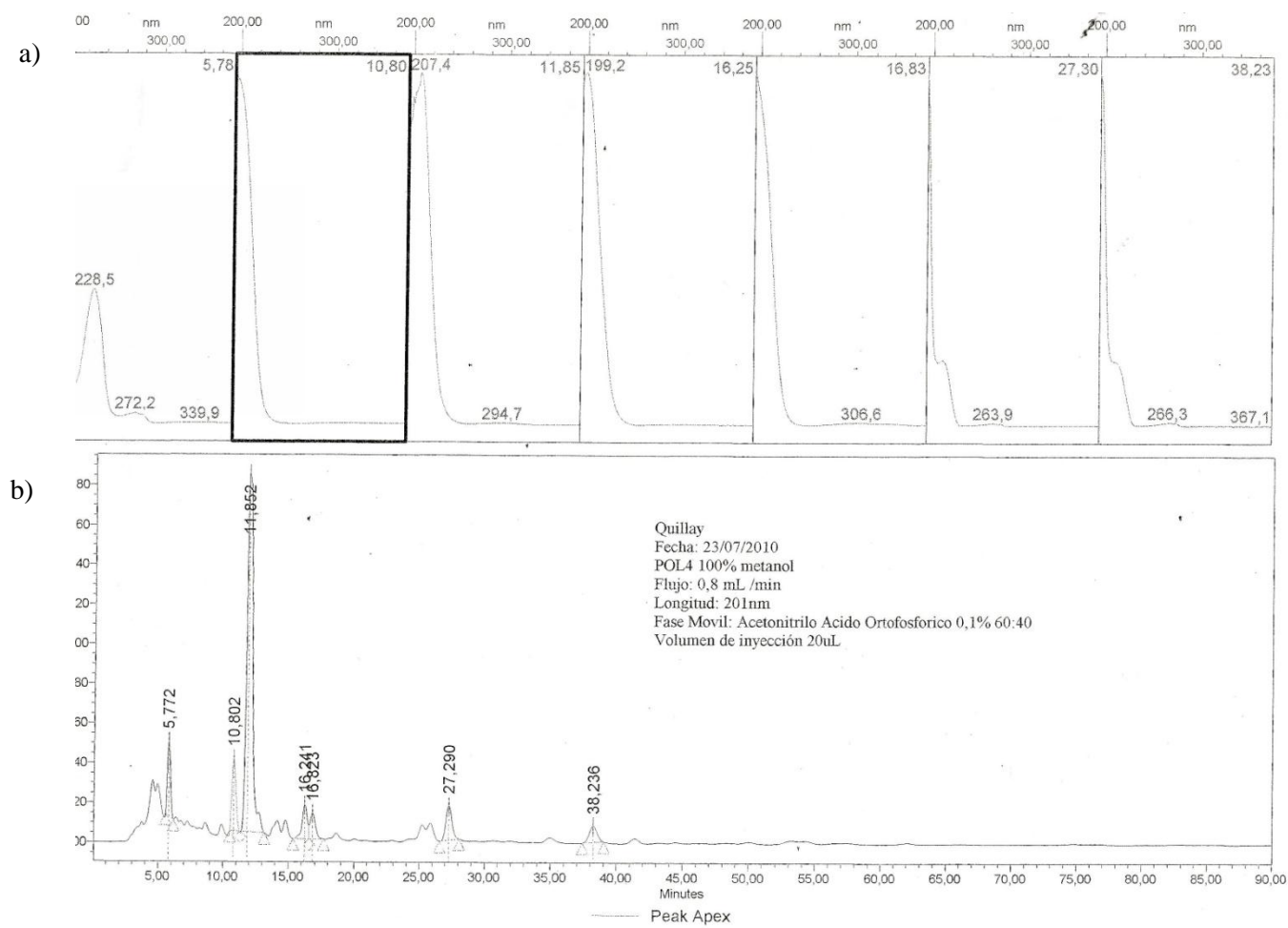
Vincken JP., Heng L., De Groot A., Gruppen H. Saponins, classification and occurrence in the plant kingdom. *Phytochemistry*. 68:276-279, 2007.

## ANEXOS

Anexo 1. Vías de ciclación del precursor de las saponinas triterpénicas y esteroidales.



**Anexo 2. Cromatograma obtenido por CLAE-DAD.**



a) Barrido al UV del ácido quillaico. b) Cromatograma obtenido CLAE-DAD

**Anexo 3.** *Quillaja*

*saponaria* Mol.



**Anexo4.** a) Inflorescencias del quillay, b) Fruto del quillay



a)  
b)



**Anexo 5.** Corteza del quillay

