



**UNIVERSIDAD DE CHILE**

**FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS Y FARMACÉUTICAS**

**Departamento de Química Farmacológica y Toxicológica  
Laboratorio de Productos Naturales**

# **SAPOGENINAS DE UN EXTRACTO DE CORTEZA**

**DE *Quillaja saponaria* Mol.**

**Aislamiento, identificación y evaluación de potencial**

**actividad hipoglicemiante *in-vitro***

**CARLOS CARTAGENA RAMÍREZ**

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

**Profesor Patrocinante:  
Dra. Carla Delporte V**

**Directores de Tesis:  
Dr. Bruce Cassels N.  
Dra. Carla Delporte V.**

**SANTIAGO - CHILE  
2010**

*Dedicado a mi madre, que me enseñó que todo lo que parece imposible y muy cuesta arriba en un principio, se puede conquistar por medio de coraje, esfuerzo y perseverancia. Agradezco también su enorme cariño y dedicación hacia mí por todos estos largos años.*

## AGRADECIMIENTOS

*Quisiera agradecer a todos aquellos que en mayor o menor medida ayudaron a que este trabajo llegase a buen puerto, especialmente:*

*A Dios, por haberme permitido encontrar a personas maravillosas y por darme una vida tan tranquila, en donde la mayoría de las vivencias que he pasado han sido muy bonitas y me han enseñado mucho.*

*A mi madre, por todo lo entregado durante todos estos años.*

*A Gabriela Fajardo, por su cariño, apoyo, comprensión y por todos los gratos momentos vividos.*

*A la Dra. Carla Delporte por todos los conocimientos entregados, su amistad, su infinita paciencia, su apoyo casi maternal para mí y todos mis compañeros y por guiarme con mucho cariño y dedicación por el largo sendero que fue esta memoria.*

*Al Dr. Bruce Cassels, por las valiosas sugerencias, la ayuda y la paciencia prestada a lo largo de toda esta memoria.*

*Al Dr. Marcelo Asencio y la Dra. Iriux Almodóvar, por la gran ayuda prestada en la interpretación de los diversos tipos de espectros.*

*A Gabriela Valenzuela, María José Queupil, Marcelo Peña, Maité Rodríguez, Pamela Zapata, Nicolás Cava, Patricio Torres, Valentina Toro, Mirtha Parada, Sylvia Arrau y Leo Goity; mis amigos y compañeros de trabajo del Laboratorio de Productos Naturales. Muchas gracias por los gratos momentos vividos y por su valiosa ayuda.*

*Al Sr. David Aravena, por su valiosa amistad y su gran voluntad desinteresada.*

*A la Sra. María Isabel Pino, por su gran amistad y por toda la ayuda y voluntad prestada.*

*A mis amigos de Química y Farmacia, cuya compañía y amistad me significó un oasis en medio del stress universitario. Especiales agradecimientos a: Rafael López, Jimena Canales, Sergio Cheuquel, Carlos Constenla, Cristina Canales y Jaime Troncoso.*

*A mi familia y al resto de mis amigos de trabajos voluntarios y del liceo.*

## TABLA DE CONTENIDOS

ÍNDICE DE FIGURAS.....	V
ÍNDICE DE TABLAS.....	VII
ÍNDICE DE ANEXOS.....	VIII
ABREVIATURAS.....	X
RESUMEN.....	XII
SUMMARY.....	XIV
<b>CAPÍTULO I</b>	
INTRODUCCIÓN.....	1
1.1. Estudios anteriores de <i>Quillaja saponaria</i> .....	2
1.1.1. Estudios químicos.....	2
1.1.2. Estudios farmacológicos.....	4
1.1.3. Otros usos.....	5
1.2. Glicógeno fosforilasa y su relación con los triterpenoides.....	5
<b>CAPÍTULO II</b>	
FICHA DESCRIPTIVA DE LA PLANTA.....	6
<b>CAPÍTULO III</b>	
HIPÓTESIS.....	7

## **CAPÍTULO IV**

OBJETIVOS.....	8
4.1. Objetivos generales.....	8
4.2. Objetivos específicos.....	8

## **CAPÍTULO V**

MATERIALES Y MÉTODOS.....	9
5.1. Parte química.....	9
5.1.1. Hidrólisis del extracto Ultra Dry 100 Q.....	9
5.1.2. Aislamiento de sapogeninas.....	9
5.1.2.1. Fraccionamiento por CC de sílica gel.....	9
5.1.2.2. Fraccionamiento por CC de Sephadex®.....	10
5.1.2.3. Monitoreo por CCF.....	11
5.1.3. Determinación estructural.....	12
5.1.4. Valoración por HPLC.....	13
5.2. Ensayo de inhibición de la GPα.....	14
5.2.1. Preparación del blanco.....	15
5.2.2. Cinética enzimática.....	15
5.2.3. Control negativo (CN).....	15
5.2.4. Evaluación de las muestras.....	16
5.2.5. Control de fosfato (CF).....	16

5.2.6. Consideraciones generales.....	17
5.2.7. Cálculo del porcentaje de inhibición (%I) de las muestras.....	17
<b>CAPÍTULO VI</b>	
<b>RESULTADOS.....</b>	<b>19</b>
6.1. Parte química.....	19
6.1.1. Hidrólisis del extracto Ultra Dry 100 Q.....	19
6.1.2. Aislamiento de sapogeninas.....	19
Columna Sil-A.....	19
Columna Sil-B.....	21
Columna Seph-B1.....	22
Columna Seph-B2.....	22
Columna Seph-B3.....	22
Columna Sil-C.....	23
Columna Seph-C1.....	24
Columna Seph-C2.....	24
6.1.3. Determinación estructural.....	25
6.1.4. Valoración por HPLC.....	33
6.2. Ensayo de inhibición de la GPa.....	37
<b>CAPÍTULO VII</b>	
<b>DISCUSIÓN.....</b>	<b>42</b>

7.1. Parte química.....	42
7.2. GPa y su relación con las sapogeninas del quillay.....	49
<b>CAPÍTULO VIII</b>	
CONCLUSIONES.....	51
<b>CAPÍTULO IX</b>	
BIBLIOGRAFÍA.....	52

## ÍNDICE DE FIGURAS

<b>Figura 1:</b>	Ejemplo de la estructura de las saponinas de la corteza de quillay.....	2
<b>Figura 2:</b>	Ácido oleanólico y su numeración, válida para las sapogeninas de quillay.....	3
<b>Figura 3:</b>	Esquema del fraccionamiento del extracto acuoso Ultra Dry 100-Q y obtención de las sapogeninas.....	25
<b>Figura 4:</b>	Estructura química propuesta para Qy1.....	26
<b>Figura 5:</b>	Estructura química propuesta para Qy5.....	28
<b>Figura 6:</b>	Estructura química propuesta para Qy6.....	31
<b>Figura 7:</b>	Cromatograma HPLC para Qy5 (580 ppm en MeOH 100% a 201 nm).....	34
<b>Figura 8:</b>	Cromatograma HPLC para Qy1 (480 ppm en MeOH 100% a 201 nm).....	34
<b>Figura 9:</b>	Cromatograma HPLC para el producto de hidrólisis (407 ppm en MeOH 100% a 201 nm).....	35
<b>Figura 10:</b>	Curva de calibración para Qy5: valores de concentración vs área.....	36
<b>Figura 11:</b>	Curva de calibración para Qy1: valores de concentración vs área.....	36
<b>Figura 12:</b>	Efecto inhibitorio de Qy1 y cafeína sobre la GPa.....	39
<b>Figura 13:</b>	Efecto inhibitorio de Qy3 y cafeína sobre la GPa.....	39
<b>Figura 14:</b>	Efecto inhibitorio de Qy5 y cafeína sobre la GPa.....	40
<b>Figura 15:</b>	Efecto inhibitorio de Qy6 y cafeína sobre la GPa.....	40
<b>Figura 16:</b>	Estructuras químicas de las sapogeninas descritas en la corteza de quillay.....	42



<b>Figura 17</b>	Triterpenoides naturales que presentan insaturaciones entre C-13 y C-18 aislados de <i>Centella asiática</i> .....	43
<b>Figura 18</b>	Estructura química de algunos triterpenoides naturales que poseen dobles enlaces distintos a C-12/13.....	44
<b>Figura 19</b>	Conversión del ácido quillaico a su isómero olean-13(18)-eno.....	45
<b>Figura 20</b>	Esquema de formación de derivados olean-13(18)-en-28-oicos (I) y lactónicos (II) mediante catálisis ácida de ácidos 18 $\alpha$ -olean-12-en-28-oicos. Tomado de Savina <i>et al.</i> (1986).....	46

## ÍNDICE DE TABLAS

<b>Tabla 1:</b>	Dimensiones recomendadas para el montaje de la CC de sílica gel.....	10
<b>Tabla 2:</b>	Composición y fracciones obtenidas de la CC Sil-A.....	20
<b>Tabla 3:</b>	Composición y fracciones obtenidas de la CC Sil-B.....	21
<b>Tabla 4:</b>	Composición y fracciones obtenidas de la CC Sil-C.....	23
<b>Tabla 5:</b>	Sapogeninas aisladas a partir de CC Seph-C2 y sus principales características.....	24
<b>Tabla 6:</b>	Comparación de los espectros RMN del ácido quillaico versus Qy1.....	27
<b>Tabla 7:</b>	Comparación de los espectros RMN del ácido fitolacagénico versus Qy5.....	29
<b>Tabla 8:</b>	Señales de $^1\text{H}$ y $^{13}\text{C}$ -RMN para el compuesto Qy6.....	32
<b>Tabla 9:</b>	Datos de la curva de calibración para Qy5 (valores de concentración vs. área).....	35
<b>Tabla 10:</b>	Datos de la curva de calibración para Qy1 (valores de concentración vs. área).....	36
<b>Tabla 11:</b>	%I de las sapogeninas de quillay a distintas concentraciones ( $\mu\text{M}$ ).....	38
<b>Tabla 12:</b>	%I de la cafeína a distintas concentraciones ( $\mu\text{M}$ ).....	38
<b>Tabla 13:</b>	Resumen de los principales parámetros evaluados en las muestras utilizadas en el ensayo de la GPa.....	41
<b>Tabla 14:</b>	Efecto inhibitorio sobre la GPa de diversos triterpenoides naturales (basado en el trabajo de Luo <i>et al.</i> , 2008).....	49

## ÍNDICE DE ANEXOS

<b>Anexo A</b>	Fotografía del árbol de quillay, de las flores en forma de estrella y del fruto abierto con parte de la lámina foliar de fondo.....	60
<b>Anexo B</b>	CCF de algunas de las sapogeninas aisladas de la corteza de quillay.....	61
<b>Anexo C</b>	Espectros de RMN de Qy1 aislado de un extracto acuoso de corteza de quillay.....	62
Anexo C1	Espectro de $^1\text{H}$ .....	62
Anexo C2	Espectro de $^{13}\text{C}$ .....	63
Anexo C3	Espectro DEPT 135.....	64
<b>Anexo D</b>	Espectros de RMN de Qy5 aislado de un extracto acuoso de corteza de quillay.....	65
Anexo D1	Espectro de $^1\text{H}$ .....	65
Anexo D2	Espectro de $^{13}\text{C}$ .....	66
Anexo D3	Espectro DEPT 135.....	67
<b>Anexo E</b>	Espectros de RMN de Qy6 aislado de un extracto acuoso de corteza de quillay.....	68
Anexo E1	Espectro de $^1\text{H}$ .....	68
Anexo E2	Espectro de $^{13}\text{C}$ .....	69
Anexo E3	Espectro DEPT 135.....	70
Anexo E4	Espectro COSY.....	71

Anexo E5	Espectro HSQC.....	72
Anexo E6	Espectro HMBC.....	73
<b>Anexo F</b>	Espectros de RMN de Qy3 aislado de un extracto acuoso de corteza de quillay.....	74
Anexo F1	Espectro de $^1\text{H}$ .....	74
Anexo F2	Espectro de $^{13}\text{C}$ .....	75
Anexo F3	Espectro DEPT 135.....	76
Anexo F4	Espectro COSY.....	77
Anexo F5	Espectro HSQC.....	78
Anexo F6	Espectro HMBC.....	79
<b>Anexo G</b>	Espectros de masa.....	80
Anexo G1	Espectro de masa de ionización química de Qy1.....	80
Anexo G2	Espectro de masa de ionización química de Qy5.....	81
Anexo G3	Espectro de masa de ionización química de Qy6.....	82
Anexo G4	Espectro de masa de impacto electrónico de Qy6.....	83
Anexo G5	Espectro de masa de ionización química de Qy3.....	84

## ABREVIATURAS

- % I:** Porcentaje de inhibición de la enzima glicógeno fosforilasa a.
- % I máx:** Porcentaje de inhibición máxima de la enzima glicógeno fosforilasa a.
- <sup>13</sup>C-RMN:** Espectroscopia de resonancia magnética nuclear de <sup>13</sup>C.
- <sup>1</sup>H-RMN:** Espectroscopia de resonancia magnética nuclear de <sup>1</sup>H.
- A:** Absorbancia.
- AcOEt:** Acetato de etilo.
- Acorr:** Absorbancia corregida.
- CC:** Columna cromatográfica.
- CCF:** Cromatografía en capa fina.
- CD<sub>3</sub>OD:** Metanol deuterado
- CDCl<sub>3</sub>:** Cloroformo deuterado
- CF:** Control de fosfato.
- CN:** Control negativo.
- COSY:** Correlation spectroscopy.
- DCM:** Diclorometano.
- DEPT:** Distortionless enhancement by polarization transfer.
- DMSO:** Dimetilsulfóxido.
- EtOH:** Etanol.
- Fr:** fracción
- GP<sub>a</sub>:** Glicógeno fosforilasa activada.
- HEX:** Hexano.
- HMBC:** Heteronuclear multiple bond correlation.
- HPLC:** Cromatografía líquida de alta eficacia.
- HSQC:** Heteronuclear single quantum correlation.
- Hz:** Hertz
- IC<sub>50</sub>:** Concentración que produce el 50% de inhibición
- J:** Constante de acoplamiento
- MeOH:** Metanol.

**mg:** Milígramo  
**MHz:** Megahertz  
**min:** Minutos  
**mL:** Mililitro  
**mM:** Milimolar  
**MS:** Espectrometría de masas.  
**m.s.n.m.:** metros sobre el nivel del mar  
**nm:** Nanómetro  
**PM:** Peso molecular  
**Pol-1:** Fracciones de polaridad más baja  
**Pol-2:** Fracciones de polaridad media-baja  
**Pol-3:** Fracciones de polaridad media  
**Pol-4:** Fracciones de polaridad media- alta  
**Pol-5:** Fracciones de polaridad alta  
**ppm:** Partes por millón  
**Rf:** Factor de retención.  
**RMN:** Resonancia magnética nuclear.  
**RP-HPLC:** Cromatografía líquida de alta eficacia en fase reversa.  
**μL:** Microlitro  
**μM:** Micromolar

## RESUMEN

El quillay, *Quillaja saponaria* Mol., Quillajaceae, es un árbol de la zona central de Chile usado desde tiempos precolombinos como detergente. Sus saponinas crudas se utilizan como agentes espumantes y emulsificantes; y en forma más purificada, para la preparación de vacunas y otros productos medicinales. Las saponinas del quillay han sido caracterizadas como una mezcla compleja de glicósidos y ésteres azucarados de ácido quillaico; y ocasionalmente, de ácido equinocístico, 22 $\beta$ -hidroxi-quillaico o fitolacagénico.

En el presente trabajo, se utilizó un extracto acuoso de corteza de quillay el cual se hidrolizó con HCl al 18% y calentamiento a reflujo para obtener un producto de hidrólisis al que se le purificó mediante sucesivas columnas cromatográficas de sílica gel G y Sephadex® LH-20. Se aislaron 6 sapogeninas triterpénicas denominadas Qy1, Qy2, Qy3, Qy4, Qy5 y Qy6. Qy1 fue identificada como ácido quillaico, Qy5 como ácido fitolacagénico, mientras que Qy6 se caracterizó como el isómero olean-13(18)-eno del ácido quillaico, un artefacto formado a partir de Qy1 en medio ácido. El resto de las sapogeninas, en tanto, aún no han sido completamente identificadas. La caracterización de los compuestos se realizó mediante espectrometría de masas y espectroscopía de resonancia magnética nuclear unidimensional y bidimensional.

En el caso de la valoración por HPLC, el ácido quillaico demostró ser la sapogenina mayoritaria dentro del extracto acuoso (68,9% dentro del producto de hidrólisis, mientras que ácido fitolacagénico estuvo presente en un 5,0%).

En el ensayo de inhibición de la glicógeno fosforilasa a (GPa), una enzima implicada en la biosíntesis de glucosa cuya actividad se incrementa en la diabetes; fueron evaluados Qy1, Qy3, Qy5, Qy6 y el producto de hidrólisis. Los resultados demostraron que todos los compuestos fueron menos potentes que la cafeína, el compuesto de referencia. Sin embargo, Qy3 demostró ser el único triterpenoide más eficaz que la cafeína (81,5% versus 68,4%), indicando que al menos una sapogenina de la corteza de quillay presentó una significativa actividad inhibitoria de la GPa.

Es importante recalcar que si bien Qy3 fue el compuesto más activo, tanto en potencia como en eficacia, el producto de hidrólisis presentó una potencia casi nula y una eficacia de 16,8%. Estos resultados podrían ser explicados por el hecho de que Qy3 se encontró en baja

concentración dentro de éste, o bien, otros constituyentes del producto de hidrólisis pudieron tener efectos antagonistas.

En síntesis, esta memoria contribuyó a ampliar el conocimiento de la composición química de este árbol autóctono y se pudo evaluar su efecto sobre la GPA, demostrando que Qy3 es el triterpenoide más eficaz.



## SUMMARY

“SAPOGENINS OF AN AQUEOUS *Quillaja saponaria*, Mol BARK EXTRACT  
Isolation, identification and evaluation of a potential *in-vitro* hypoglycemic effect”

Quillay, *Quillaja saponaria* Mol., Quillajaceae, is a Chilean central zone tree, used since pre-Columbian times as a detergent agent. Its raw saponins are employed as foaming and emulsifier agents; and most purified form, in the elaboration of vaccines and other medicinal products. Quillay saponins have been characterized as a complex mixture of quillaic acid with glycosides and esters, and occasionally, of echinocystic acid, 22 $\beta$ -hydroxy-quillaic acid or phytolaccagenic acid.

In the present work, an aqueous quillay bark extract was hydrolyzed with HCl 18% and warmed to reflux in order to get a hydrolysis product, which was later purified consecutively into G silica gel and Sephadex® LH-20 columns. Six triterpenic saponogenins were isolated, called Qy1, Qy2, Qy3, Qy4, Qy5 and Qy6. Qy1 was identified as quillaic acid, Qy5 as phytolaccagenic acid, while Qy6 was characterized as the olean-13(18)-en isomer of quillaic acid, an artifact formed from Qy1 in acid media. Other saponogenins haven't been completely identified yet. The structural characterization of compounds was made by mass spectrometry and mono and bi-dimensional nuclear magnetic resonance spectroscopy.

In the case of HPLC quantification, quillaic acid demonstrated to be the most abundant saponogenin obtained from the aqueous extract (68,9% on the hydrolysis product, while phytolaccagenic acid was present in a 5,0%).

In the glycogen phosphorylase a (GPa) inhibition assay, an enzyme involved in the glucose biosynthesis which shows an increased activity in diabetes; Qy1, Qy3, Qy5, Qy6 and the hydrolysis product were evaluated. The results demonstrated that all the compounds were much less potent than caffeine, the reference compound. However, Qy3 was as far as the only triterpenoid more efficacious than caffeine (81,5% versus 68,4%). These issues indicated that at least one quillay cortex saponogenin performed a significative GPa inhibitory activity.

It's important to remark that although Qy3 was the most active compound in potency and efficacy, the hydrolysis product showed almost null potency and efficacy near to 16,8%. These

results could be explained by the fact that Qy3 was in low concentration, or other constituents of the hydrolysis product could have an antagonist effects.

In summary, this thesis contributed to increase the knowledge of the chemical composition of this autochthon tree and its effect on GPa could be evaluated, demonstrating that Qy3 was the most efficacious triterpenoid.

## I. INTRODUCCIÓN

La búsqueda en la naturaleza de elementos que permitan facilitar nuestra vida cotidiana siempre ha estado presente desde tiempos inmemoriales. Es por ello que desde épocas precolombinas se conoce el quillay, un árbol cuya corteza posee una asombrosa capacidad para producir espuma, cualidad asociada principalmente a sus saponinas, una gran familia de moléculas ampliamente distribuidas en la naturaleza.

Las saponinas son compuestos naturales de peso molecular superior a 500 Da alcanzando a veces valores superiores a 2000 (San Martín y Magunacelaya, 2005), ampliamente conocidas gracias a sus propiedades surfactantes (Soeder *et al.*, 1996; Van Setten *et al.*, 1998; Hristov *et al.*, 2007). Su estructura básica consiste en agliconas no polares, esteroidales o triterpénicas, unidas a una o más cadenas azucaradas que les otorgan características anfifílicas responsables de sus propiedades tensoactivas (Mitra y Dungan, 2001).

Entre las propiedades y usos más importantes de las saponinas destacan aquellas relacionadas con la emulsificación y la producción de espuma (Güçlü-Ustündağ y Mazza, 2007); la capacidad para provocar hemólisis (Oda *et al.*, 2000; Sparg *et al.*, 2004); y como antimicrobianos e insecticidas (Sparg *et al.*, 2004). Se han reportado más de 40 propiedades biológicas distintas atribuibles a saponinas (Güçlü-Ustündağ y Mazza, 2007).

Es importante mencionar el importante auge que las saponinas tienen en cosmética (Price *et al.*, 1987; Uematsu *et al.*, 2000; Güçlü-Ustündağ y Mazza, 2007); como agente espumante en bebidas (Güçlü-Ustündağ y Mazza, 2007); y adyuvante en muchos productos farmacéuticos (Sparg *et al.*, 2004; Güçlü-Ustündağ y Mazza, 2007).

Con respecto a su biosíntesis, es probable que muchas de las saponinas sean producidas por reacción de tres unidades de isopentenil pirofosfato, originando farnesil pirofosfato (que contiene 15 átomos de carbono); condensación de dos unidades de farnesil pirofosfato para dar escualeno (30 carbonos); oxidación de éste para dar su 2,3-óxido (Vincken *et al.*, 2007) y ciclación del 2,3- óxido de escualeno (Yun *et al.*, 2008).

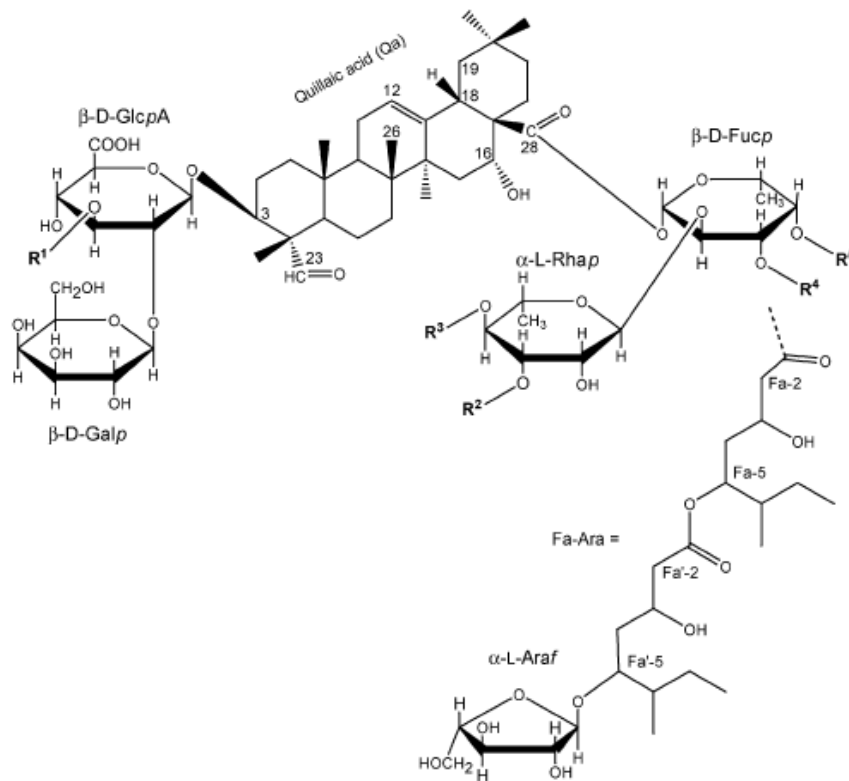
Según el tipo de migración y ciclación involucrada, se producen las diferentes saponinas (Vincken *et al.*, 2007; Meesapyodsuk *et al.*, 2007), las que pueden oxidarse y generar agliconas

más funcionalizadas. Una vez que las saponinas se glicosilan, originan las diferentes saponinas (Meesapyodsuk *et al.*, 2007).

## 1.1. Estudios anteriores de *Quillaja saponaria*

### 1.1.1. Estudios químicos

El extracto hidroalcohólico de corteza de quillay contiene alrededor de 100 saponinas (Kite *et al.*, 2004). La mayoría de ellas consisten en ácido quillaico glicosilado en C-3 y C-28 (Nyberg *et al.*, 2003).



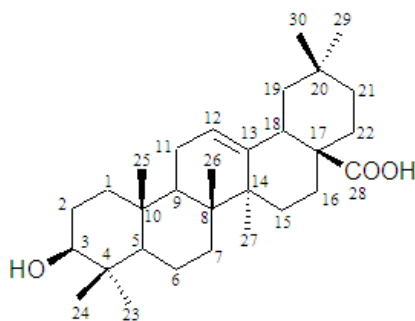
**Figura 1:** Ejemplo de la estructura de las saponinas de la corteza de quillay

El oligosacárido en C-3 es casi siempre un trisacárido ramificado compuesto de ácido  $\beta$ -D-glucopiranosilurónico, en el que se le unen  $\beta$ -D-galactopiranososa en O-2; y  $\beta$ -D-xilopiranososa o  $\alpha$ -L-ramnopiranososa en O-3 (Nyberg *et al.*, 2003).

Por otro lado, el oligosacárido que esterifica al ácido carboxílico en C-28 está constituido por el disacárido  $\alpha$ -L-ramnopiranosil (1 $\rightarrow$ 2)-  $\beta$ -D-fucopiranososa. Tanto el O-3 como el O-4 de dicha fucosa pueden formar un éster acetilado o un éster con 2 grupos acilo de 9 carbonos cada uno (3,5- dihidroxi- 6- metiloctanoil) más una L- arabinosa (Kite *et al.*, 2004).

Como muestra la **figura 1**, es posible encontrar distintos sustituyentes en el esqueleto fundamental de las saponinas del quillay. Por ejemplo, en **R<sup>2</sup>** puede existir una glucosa, mientras que en **R<sup>3</sup>** los sustituyentes pueden corresponder a xilosas y/o apiosas. Además, dentro de la literatura se han encontrado sustituyentes distintos a los mencionados (Kite *et al.*, 2004) y (Nyberg *et al.*, 2003).

Las sapogeninas del quillay son de naturaleza triterpenoide y se pueden considerar derivados del ácido oleanólico (ver **figura 2**) (Roner *et al.*, 2007), destacando la presencia de ácido quillaico como sapogenina mayoritaria, ácido equinocístico (grupo metilo en C-23), ácido fitolacagénico y 22 $\beta$ -hidroxiquillaico (Nyberg *et al.*, 2003).



**Figura 2:** Ácido oleanólico y su numeración, válida para las sapogeninas de quillay

Los extractos acuosos de corteza de quillay también contienen polifenoles, proteínas, azúcares y sales (San Martín y Briones, 2000). Cañigüeral *et al.* (1996) han reportado la presencia de taninos, abundante oxalato de calcio y almidón.

### 1.1.2. Estudios farmacológicos

Ciertas fracciones provenientes de extractos acuosos de corteza de quillay muestran importante actividad adyuvante de la respuesta inmune (Dalsgaard, 1974). Kim *et al.* (2006), en tanto, afirman que QS-21 A<sub>api</sub> y su isómero QS-21 A<sub>xy1</sub> (ambos se encuentran en la fracción N° 21 eluida en RP-HPLC) son los inmunoestimuladores más promisorios debido a su potencia y seguridad.

Por otro lado, la actividad adyuvante ha sido evaluada satisfactoriamente en ensayos clínicos donde QS-21A forma conjugados con antígenos presentes en cierto tipo de cánceres, glicoproteínas de VIH y proteínas del protozoo de la malaria (Kensil *et al.*, 1991; Kim *et al.*, 2006). El mecanismo de acción más probable es estimular la inmunidad de linfocitos T y B, además de aumentar las citoquinas tipo Th1 y Th2 (Kim *et al.*, 2006).

Las acciones recién mencionadas se deben a la capacidad de las saponinas de asociarse a colesterol y fosfolípidos, formando estructuras coloidales esféricas denominadas ISCOMs. Estas asociaciones pueden fabricarse con distintos tipos de antígenos, obteniendo un aumento significativo del título de anticuerpos *in-vivo* (Kensil *et al.*, 1991; Pham *et al.*, 2006).

Se ha visto que los compuestos mayoritarios de la mezcla de saponinas de quillay, QS-21 y las fracciones QS-7, QS-17 y QS-18, aumentan principalmente los anticuerpos IgG. QS-7 muestra un amplio perfil de seguridad, mientras que QS-18 es el componente más tóxico del extracto debido a sus propiedades hemolíticas (Kensil *et al.*, 1991; Pham *et al.*, 2006).

Con respecto a los requerimientos estructurales, el aldehído (cuando está presente) es fundamental para la actividad estimulante por vía TH1, ya que sería capaz de formar bases de Schiff con los grupos amino de ciertos receptores de las células T; mientras que la cadena lateral hidrofóbica diacética (originada en el C-28 del triterpenoide) sería efectora de la respuesta citotóxica de las células T (CD8+), aunque también cumpliría un rol importante en la toxicidad de ciertas fracciones de saponinas (Palatnik de Sousa *et al.*, 2004).

Se ha descrito que las saponinas se unen al colesterol y a los ácidos biliares en el intestino, previniendo su reabsorción. Dietas ricas en saponinas de *Yucca schidigera* y quillay generan una disminución en el colesterol sanguíneo en mamíferos e incluso en humanos hipercolesterolémicos (Kim *et al.*, 2003).

### 1.1.3. Otros usos

Los extractos acuosos e hidroalcohólicos de corteza de quillay se utilizan como agentes espumantes naturales en alimentos y bebidas, como aditivos en cosméticos, y como surfactantes en la producción de emulsiones farmacéuticas y en fotografía (Kite *et al.*, 2004).

Extractos acuosos de corteza de quillay presentan interesante actividad nematocida (San Martín y Magunacelaya, 2005) y son útiles para reducir la formación de neblinas ácidas en la minería (San Martín, *et al.*, 2005).

Por otro lado, las saponinas del quillay ayudarían a mejorar la biodisponibilidad de medicamentos debido a la capacidad de asociarse con los fosfolípidos y el colesterol de membrana (Mitra y Dungan, 2001).

Otros autores señalan que estas saponinas, que ya se usan en emulsiones de alimentos, pueden ser empleadas para disminuir el colesterol en ellos, cumpliendo una doble función en la industria alimentaria (Mitra y Dungan, 2001).

## 1.2. Glicógeno fosforilasa y su relación con los triterpenoides

La Diabetes Mellitus tipo 2 es una enfermedad ampliamente extendida en el mundo occidental. Se caracteriza por problemas en la secreción y acción de la insulina (resistencia a la insulina) que derivan en hiperglicemia, aunque también existe una excesiva producción de glucosa por parte del hígado (Martín *et al.*, 1998).

La enzima glicógeno fosforilasa hepática (existe una isoforma en el músculo) ha sido vinculada a la diabetes mellitus tipo 2, pudiendo ser un blanco importante en el tratamiento de ésta (Somsák *et al.*, 2008). Dicha enzima participa en el primer paso de la fosforólisis del glicógeno (Oikonomakos NG y Somsák, 2008) hacia glucógeno 1- fosfato, y por consiguiente, incrementa la producción de glucosa en el hígado (Martín *et al.*, 1998; Kristiansen *et al.* 2004).

En la literatura han sido evaluados al menos 25 triterpenoides naturales como inhibidores de la glicógeno fosforilasa a (GPa) de músculo de conejo, indicando que estas moléculas se unen al sitio de activación alostérica (Wen *et al.*, 2008). Dentro de los triterpenoides evaluados, se menciona el ácido oleanólico y derivados sintéticos, con interesantes actividades inhibitorias (Chen *et al.*, 2006).

## II. FICHA DESCRIPTIVA DE LA PLANTA

**Familia:** Quillajaceae.

**Nombre científico:** *Quillaja saponaria* Mol.

**Nombre vulgar:** quillay.

**Sinónimos:** Jabón de palo, quillai

**Distribución geográfica:** En Chile crece entre Coquimbo y Malleco (IV a IX Región). Habita en suelos secos y pobres hasta los 2000 m.s.n.m.

**Origen:** es originario de Chile, Perú y Bolivia (Chapagain *et al.*, 2007; PDR for Herbal Medicines, 1998), mientras que se cultiva en India y California (PDR for Herbal Medicines, 1998).

**Descripción botánica:** El árbol puede alcanzar hasta 18 metros. Las hojas son glabras, brillantes, ovaladas, coriáceas, de margen casi entero y con peciolo corto, alcanzando un tamaño de 2-5 x 1-3 cm. La corteza es gruesa, oscura y muy dura.

Por otro lado, las flores son blancas, con 5 pétalos, reunidas en racimos corimbosos en la axila de las hojas. Cuando los frutos maduran, los 5 carpelos, que están originalmente soldados a la base, dan origen a 5 folículos dispuestos a modo de estrella, con numerosas semillas, que tienen forma alada y presentan poco o ningún endospermo (PDR for Herbal Medicines, 1998).

La droga vegetal corresponde a la corteza desprovista de súber. Al microscopio presenta trozos planos o ligeramente acanalados, de color rosa claro a blanco amarillento. La superficie externa presenta estrías longitudinales groseras y manchas marrones en algunas zonas, mientras que la superficie interna es casi completamente lisa. La fractura es astillosa- fibrosa y sobre la superficie de la fractura pueden observarse al microscopio cristales prismáticos brillantes de oxalato de calcio (Cañigüeral *et al.*, 1996).

**Usos en la medicina folclórica:** Expectorante, antiinflamatorio, purificante (PDR for Herbal Medicines, 1998).



### III. HIPÓTESIS

- Por hidrólisis del extracto acuoso de corteza de quillay se pueden obtener al menos 4 sapogeninas triterpénicas, siendo la mayoritaria el ácido quillaico.
- Debido a que se han descrito una serie de triterpenoides naturales inhibidores de la GPa (Wen et al., 2008), entre los cuales destacan el ácido oleanólico y algunos de sus derivados (Chen *et al.*, 2006), es razonable postular que las sapogeninas del quillay mostrarán esta actividad.

## **IV. OBJETIVOS**

### **4.1. Objetivos generales**

- Contribuir al conocimiento químico y biológico de la corteza de quillay.

### **4.2. Objetivos específicos**

- Optimizar el rendimiento del producto de hidrólisis del extracto Ultra Dry 100 Q
- Aislar, identificar y cuantificar las geninas mayoritarias dentro del producto de hidrólisis.
- Montar técnica de inhibición de la GPa.
- Evaluar compuestos triterpenoides con eventual actividad hipoglicemiante.

## V. MATERIALES Y MÉTODOS

### 5.1. Parte química

#### 5.1.1. Hidrólisis del extracto Ultra Dry 100 Q

Ultra Dry 100 Q<sup>®</sup> es un extracto acuoso purificado y secado en spray, proveniente de la corteza de *Quillaja saponaria*, Mol, que contiene un 93% de sólidos (Roner *et al.*, 2007).

Para realizar la hidrólisis, se pesaron 20 g de extracto Ultra Dry 100 Q y se mezclaron con una solución acuosa de 500 mL de HCl al 18% con calentamiento a reflujo durante 2 horas. El sólido remanente se filtró al vacío, se lavó con abundante agua y se llevó hasta sequedad en estufa para calcular rendimiento. Al sólido final que se obtuvo en esta serie de procesos se le denominó producto de hidrólisis.

#### 5.1.2. Aislamiento de sapogeninas

##### 5.1.2.1. Fraccionamiento por columna cromatográfica (CC) de sílica gel

Al producto de hidrólisis obtenido en el punto anterior se le realizó un fraccionamiento en CC de sílica gel. La técnica se denomina “Cromatografía rápida seca” y tiene como ventaja ser un medio barato y rápido para la separación preparativa de muestras que requieren resolución moderada (Still *et al.*, 1978).

La muestra a fraccionar se mezcló con una cantidad menor o igual a su peso en sílica gel y se homogenizó con ayuda de acetona en un mortero. Dicho proceso también ayudó a volatilizar el solvente.

Una vez que el disolvente se volatilizó, el sólido se secó en estufa hasta completa sequedad. A continuación, la muestra se hizo pasar por un tamiz, originando la “cabeza” de la CC.

Por otra parte, se pesó una cantidad de sílica gel al menos 5 veces mayor a la “cabeza” en altura, constituyendo el “cuerpo” de la columna. Otros autores (Still *et al.*, 1978) indican que

existe una proporción a seguir según la cantidad de muestra a fraccionar, como se aprecia en la **tabla 1**.

**Tabla 1:** Dimensiones recomendadas para el montaje de la CC de sílica gel

<b>Diámetro columna/ altura columna (mm)</b>	<b>Peso gel de sílice (g)</b>	<b>Peso de muestra</b>	<b>Volumen de fracción de solvente (mL)</b>
30/45	15	16-300 mg	10-15
40/50	30	500 mg- 3 g	15-20
70/55	100	2- 15 g	20-50

El siguiente paso fue seleccionar la columna, agregar un papel filtro sobre la frita y conectar la columna a un matraz Kitasato. A continuación se mezcló el cuerpo con diclorometano (DCM) y se agregó en forma de pasta a la columna. Una vez que este proceso se realizó cuantitativamente, se esperó que la sílica gel decante y que su superficie fuese plana. Recién en ese momento se añadió vacío para eliminar completamente el DCM, compactar la sílica gel y dejar la columna seca.

Luego se agregó un segundo papel filtro, seguido de la cabeza, y se homogenizó con ayuda de presión mecánica y vacío (sin solvente). Una vez que la superficie de la cabeza no presentó irregularidades, se agregó un tercer papel filtro y algodón.

Para eluir la primera fracción se activó el sistema de vacío, se agregó un volumen adecuado de fase móvil y se cortó el vacío hasta cuando la columna ya no goteó más.

Las distintas fracciones se monitorearon por medio de cromatografía en capa fina (CCF, ver más abajo). Aquellas que presentaron un perfil cromatográfico similar se juntaron y se rotavaporaron para realizar otra columna de sílica gel o Sephadex®.

#### **5.1.2.2. Fraccionamiento por CC de Sephadex®**

Las muestras que contenían sapogeninas medianamente purificadas obtenidas en las columnas de sílica gel se disolvieron en una mezcla de solventes consistente en hexano (HEX): diclorometano (DCM): metanol (MeOH) en proporciones 6: 2: 1. Para eliminar sólidos remanentes, la muestra se sonicó o se filtró con un filtro simple.

La solución resultante se hizo pasar por una CC de fase estacionaria Sephadex® LH-20.

Cabe destacar que la cantidad de muestra a separar depende del volumen de reposo del Sephadex® LH-20 de la columna y del grado de resolución que se desea obtener, pero se recomienda hasta un 2% del volumen de reposo del Sephadex®. Así, para una columna que tiene una altura de 33,5 cm y un diámetro interno aproximado de 4,6 cm, se debió agregar hasta 20 ml de fase móvil saturada con muestra.

En el presente trabajo, la fase móvil utilizada siempre consistió en el mismo sistema de solventes HEX: DCM: MeOH en proporciones 6: 2: 1.

Se recolectaron aproximadamente 90 fracciones de eluyente, cada una conteniendo un volumen de 40 mL aproximadamente.

Para el monitoreo de la extracción de las diferentes fracciones en la columna, se utilizó la CCF (ver **punto 5.1.2.3**). Bajo esta perspectiva, las fracciones que presentaron similar perfil cromatográfico se juntaron y se rotavaporaron, pudiendo ser llevadas a otra CC de Sephadex® bajo las mismas condiciones si es que aún no presentaban la pureza requerida, o en caso contrario, ser sometidas a un completo estudio mediante resonancia magnética nuclear (RMN) y espectrometría de masa (MS) para su elucidación estructural.

Una vez que la CCF no demostró presencia de sapogeninas, la CC se lavó con metanol.

### **5.1.2.3. Monitoreo por CCF**

Para el monitoreo de la extracción de las diferentes fracciones en la columna se utilizó la técnica de CCF, la cual emplea una cámara saturada en un sistema de solventes (fase móvil) en donde se introduce el cromatofolio de sílica gel 60 F<sub>254</sub> que contiene la muestra en su parte inferior. El solvente sube por capilaridad en el cromatofolio, arrastrando y separando los distintos componentes de la muestra en función de su polaridad. Eventualmente se puede obtener el R<sub>f</sub>, que es el cociente entre la distancia del punto de sembrado de la muestra hasta la mancha del compuesto de interés y la distancia del punto de sembrado hasta el frente de solvente. Esta proporción, junto con la coloración de la mancha y la comparación con una sapogenina de referencia (a medida que se van aislando), sirvieron como indicio para determinar en forma cualitativa frente a qué compuesto nos encontrábamos.

El sistema de solventes empleado en las CCF a lo largo de toda esta memoria consistió únicamente en una mezcla de acetato de etilo (AcOEt): DCM 1: 1, mientras que el reactivo revelador fue una mezcla que contenía p-anisaldehído, MeOH, ácido acético glacial y ácido sulfúrico.

Luego de la adición del reactivo revelador por medio de un pulverizador, el cromatofolio se calentó en una placa calefactora a 100° C hasta la aparición de color.

### 5.1.3. Determinación estructural

Para la elucidación estructural de los compuestos en estudio, se usaron técnicas de RMN uni- y bi dimensionales, MS y datos de la literatura.

Para las sapogeninas Qy-1 y Qy-5, los espectros de RMN de una dimensión (<sup>1</sup>H-RMN y <sup>13</sup>C-RMN) fueron registrados en un instrumento NMR- Spektrometer Varian INOVA 500 (500 MHz). Las sapogeninas restantes fueron sometidas a estudios espectroscópicos en un Espectrómetro Avance Bruker (400 MHz y 100 MHz) con sonda de determinación inversa de 5 mm y con gradientes en Z. Los solventes utilizados fueron CDCl<sub>3</sub> o CD<sub>3</sub>OD, según la solubilidad de las distintas sapogeninas.

La asignación de las señales fue hecha, según las necesidades, con la asistencia de DEPT 135, DEPT 90, COSY, HMBC y HSQC. Los valores de desplazamiento químico se expresaron en δ y las constantes de acoplamiento (*J*) en Hz.

El espectro de masas de alta resolución fue obtenido en un espectrómetro de masas FT-ICR equipado con una celda Infinity<sup>TM</sup>, que contiene un magneto superconductor a un campo de 7,0 Tesla. (Equipo FT-ICR-Massenspektrometer Bruker Apex III 70e Fourier Transform- Ion Cyclotron Resonance – MS mit IRMPD, Ionenquellen: ESI, APCI y Nanospray).

Además, se utilizó un espectro de masas MAT 95XP de Thermo Finnigan con analizador de doble enfoque, sector magnético y eléctrico. En el caso de la ionización por impacto de electrones, EI, la energía fue de 70 eV. Para este caso particular, se realizó scan magnético.

#### 5.1.4. Valoración por HPLC

Para la cuantificación de las sapogeninas por HPLC se tomó como modelo de fase móvil la utilizada para la determinación de triterpenoides de *Centella asiatica* (Morganti *et al.*, 1999; Schaneberg *et al.*, 2003; British Pharmacopeia, 2001), variando la composición y el flujo según las condiciones que se disponen en el laboratorio.

El contenido de Qy1 y Qy5 fue calculado a partir de las curvas de calibración obtenidas, utilizando como patrones los triterpenoides aislados desde el Ultra Dry 100Q obtenido de la corteza de *Quillaja saponaria*.

Las características del equipo fueron:

- Columna: C18, LiChroCART® 250 x 4 Purospher® STAR RP-18 (5 µm). Merck.
- Flujo: 0,8 mL/ min.
- Fase móvil: acetonitrilo : H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> al 0,1% en agua = 60: 40 v/v.
- Volumen de inyección: 20 µl.
- Longitud de onda: 201 nm.
- Todos estos análisis fueron desarrollados en un equipo HPLC Waters 600 acoplado a un detector de fotodiodos Waters 996.

Para obtener la curva de calibración de las sapogeninas en estudio, se preparó una solución stock de 400 ppm de Qy1 en metanol LiChrosolv para HPLC y se diluyó a 200; 100; 50 y 25 ppm. En el caso de Qy5 se preparó una solución madre de 580 ppm en el mismo solvente y se diluyó a 290; 145; 72,5 y 36,25 ppm. Luego de eso, las soluciones de sapogeninas fueron inyectadas al equipo de HPLC.

Para preparar la solución de producto de hidrólisis en el que se determinará el porcentaje de las sapogeninas aisladas, se pesaron 8,5 mg de dicho producto y se aforaron a 10 mL con MeOH grado HPLC (concentración de la solución de producto de hidrólisis en MeOH: 0,85 mg/mL).

Para cuantificar por HPLC a Qy5, se inyectó aquella preparación de 0,85 mg/ mL de producto de hidrólisis, mientras que para valorar Qy1, se diluyó 10 veces dicha solución (se tomó 0,1 mL de producto de hidrólisis a 0,85 mg/ mL y se aforó a 1 mL con MeOH) y se inyectó al equipo.

Cada solución preparada debió sonicarse por 15 minutos y filtrarse a través de una membrana Gv (Durapore) 0,22  $\mu\text{m}$  de poro (GVWP01300) en un dispositivo Swinnex® (SX0001300) adquiridos de Millipore Corp., Billerica, MA, USA y acoplado a jeringa de vidrio.

La muestra filtrada se recibió en los viales, que una vez listos, se inyectaron en el autosampler.

## 5.2. Ensayo de inhibición de la GP<sub>a</sub>

Este ensayo se basa en un método colorimétrico que detecta la liberación de fosfato al medio, basado en el método modificado de Martin *et al.* (1998). Aquí, la GP<sub>a</sub> de músculo de conejo cataliza la reacción de síntesis (elongación) de glicógeno a partir de un partidor de éste, incorporando unidades sucesivas de glucosa proveniente de la glucosa 1- fosfato, y liberando fosfato cuantificable.

La metodología a utilizar se modificó según el trabajo de Karis *et al.* (2009) para nuestras condiciones de laboratorio.

La enzima se agregó a un volumen total de 250  $\mu\text{L}$  de tampón que contenía HEPES 50 mM (pH 7.2), KCl 100 mM, EGTA 2.5 mM,  $\text{MgCl}_2$  2.5 mM, glucosa-1-fosfato 0.5 mM, glicógeno 1 mg/mL y las muestras a evaluar disueltas en DMSO, este último punto según Wen *et al.* (2008).

El tiempo de incubación se evaluó según la cinética enzimática de la reacción, determinándose en 20 minutos a 22°C (ver “**Cinética enzimática**” más abajo), período que se incluye en la zona lineal de un gráfico de concentración de producto versus tiempo. Luego de esto, se agregó una solución denominada “medio de detención”, que consistió en 750  $\mu\text{L}$  de HCl 1 M, molibdato de amonio 10 mg/mL y verde de malaquita 0.38 mg/mL; se cronometraron 5 minutos y se procedió a leer la absorbancia (**A**) a los 620 nm con cubetas de cuarzo en un equipo UNICAM UV/ Vis Spectrometer N° de serie 0222902.

Los datos se analizaron según el programa GraphPad Prism 5 Demo.

La secuencia de operaciones se puede describir de la siguiente forma:



### **5.2.1. Preparación del blanco**

Se prepararon en dos tubos eppendorf 1 mL de soluciones blanco que contenían: 75  $\mu$ L de solución HEPES 167 mM (pH 7.2)/ KCl 333 mM/ EGTA 8 mM/ MgCl<sub>2</sub> 8 mM; 25  $\mu$ L de GPa en Hepes 50 mM (pH 7.2), 125  $\mu$ L de Hepes 50 mM; 25  $\mu$ L de DMSO y 750  $\mu$ L de medio de detención. Luego se traspasaron a una cubeta de cuarzo para realizarles el ZERO BASE.

### **5.2.2. Cinética enzimática**

A una concentración fija de enzima (entre 20 y 50  $\mu$ g/mL) se realizaron mediciones de fosfato liberado cada 5 minutos por triplicado para determinar el tiempo de incubación adecuado de la reacción. Fue necesario que este tiempo ocurriese en la zona lineal antes del plató de estado estacionario.

En un tubo eppendorff se agregaron 75  $\mu$ L de solución de HEPES 167 mM (pH 7.2)/ KCl 333 mM/ EGTA 8 mM/ MgCl<sub>2</sub> 8 mM; 62,5  $\mu$ L de glicógeno a concentración 4 mg/mL; 25  $\mu$ L de HEPES 50 Mm pH 7.2; 62,5  $\mu$ L de glucosa 1-fosfato a concentración 1 mM y se procedió a homogenizar con micropipeta cuidando de no presentar salpicaduras. Posteriormente, se agregaron 25  $\mu$ L de la enzima GPa (en HEPES 50 Mm pH 7.2) a concentraciones que pudieron variar entre 20 y 50  $\mu$ g/mL según el valor óptimo de absorbancia (entre 0,6 y 0,8) y se esperaron 20 minutos.

Trascurrido este tiempo, se agregaron 750  $\mu$ L de medio de detención y se esperaron otros 5 minutos para leer al espectrofotómetro en cubeta de cuarzo.

### **5.2.3. Control negativo (CN)**

Se realizó por triplicado en un tubo eppendorf completando 1 mL de solución.

Para empezar, se agregaron 75  $\mu$ L de solución de HEPES 167 mM (pH 7.2)/ KCl 333 mM/ EGTA 8 mM/ MgCl<sub>2</sub> 8 mM; 62,5  $\mu$ L de glicógeno a concentración 4 mg/mL; 25  $\mu$ L de DMSO; 62,5  $\mu$ L de glucosa 1-fosfato a concentración 1 mM y se procedió a homogenizar con micropipeta cuidando de no presentar salpicaduras. Posteriormente se agregaron 25  $\mu$ L de la

enzima GPa (en HEPES 50 Mm pH 7.2) a concentraciones que podían variar entre 20 y 50 µg/mL según el valor óptimo de absorbancia, (entre 0,6 y 0,8) y se esperaron 20 minutos.

Luego de este tiempo, se agregaron 750 µL de medio de detención y se esperaron otros 5 minutos para leer al espectrofotómetro en cubeta de cuarzo.

#### **5.2.4. Evaluación de las muestras**

Se realizó en forma casi idéntica al punto anterior, e igualmente por triplicado.

Se agregaron 75 µL de solución de solución de HEPES 167 mM (pH 7.2)/ KCl 333 mM/ EGTA 8 mM/ MgCl<sub>2</sub> 8 mM; 62,5 µL de glicógeno 4 mg/mL; 25 µL de compuesto a evaluar (a diferentes concentraciones) en DMSO; 62,5 µL de glucosa 1-fosfato 1 mM y se procedió a homogenizar con micropipeta cuidando de no presentar salpicaduras. A continuación se agregaron 25 µL de la enzima GPa (en Hepes 50 Mm pH 7.2) a la concentración determinada en el punto anterior y se esperaron 20 minutos.

Luego de este tiempo, se agregaron 750 µL de medio de detención y se esperaron otros 5 minutos para leer la absorbancia (**A**) de la muestra al espectrofotómetro.

Es importante cerciorarse que los compuestos a evaluar no precipiten bajo estas condiciones.

Se debe consignar que bajo este punto se evaluaron como muestra los triterpenoides aislados Qy1, Qy3, Qy5, Qy6, el producto de hidrólisis y la cafeína, que corresponde a la molécula inhibitoria de referencia para esta enzima (Martin *et al.*, 1998; Wen *et al.*, 2008; Chen *et al.*, 2006).

#### **5.2.5. Control de fosfato (CF)**

Este control tuvo como objetivo contrarrestar cualquier evidencia de fosfato proveniente de las muestras a evaluar, efectuándose también por triplicado.

Para realizarlo, se debió registrar la absorbancia 5 minutos después de preparar en tubos eppendorf soluciones que contenían: 75 µL de solución de HEPES 167 mM (pH 7.2)/ KCl 333 mM/ EGTA 8 mM/ MgCl<sub>2</sub> 8 mM; 150 µL de Hepes 50 mM; 25 µL de muestra a evaluar en DMSO y 750 µL de medio de detención.

### 5.2.6. Consideraciones generales

- Los datos de tiempo óptimo que otorgó la cinética enzimática se realizaron sólo una vez, mientras que los puntos **5.2.1.**, **5.2.3.**, **5.2.4.** y **5.2.5.** se efectuaron cada vez que se encendió el espectrofotómetro para evaluar un compuesto.
- Cada vez que se preparó una solución para emplearse en este ensayo, se le añadió medio de detención para verificar que estuviese libre de fosfato.
- Para eliminar el verde de malaquita de las cubetas de cuarzo, éstas se lavaron con acetona o metanol. Sin embargo, se debió realizar un posterior lavado con agua mili-Q luego de este paso para eliminar el fosfato que viene incluido en estos solventes.

### 5.2.7. Cálculo del porcentaje de inhibición (%I) de las muestras

El control negativo (CN) representó la actividad máxima de la enzima bajo nuestras condiciones, ya que no presentó inhibidores de ningún tipo. A este valor se le designó el 100% de actividad.

Por otra parte, se debió informar la absorbancia corregida (**A<sub>corr</sub>**) del ensayo debida a cada compuesto evaluado, que correspondió a la resta de la absorbancia otorgada por el equipo en el punto **5.2.4.**, menos el control de fosfato para cada muestra, que fue dado por el punto **5.2.5.**, como indica siguiente ecuación:

$$A_{\text{corr}} = A_{\text{muestra}} - A_{\text{control fosfato}}$$

Cada absorbancia corregida se debió dividir por el promedio de la absorbancia del control negativo y multiplicarse por 100, obteniendo un % de actividad para cada concentración de muestra, como se indica a continuación:

$$\% \text{ Actividad} = (A_{\text{corr}} / A_{\text{control negativo}}) \times 100$$

Si a 100 se resta el porcentaje de actividad, se obtiene el % I de la muestra:

$$\% I = 100 - \% \text{ Actividad}$$

Este último parámetro fue graficado en función del logaritmo en base 10 de la concentración del inhibidor para obtener el IC<sub>50</sub> de cada compuesto.

Los gráficos y los IC<sub>50</sub> fueron obtenidos del programa estadístico GraphPad Prism 5 Demo.

## VI. RESULTADOS

### 6.1. Parte química

#### 6.1.1. Hidrólisis del extracto Ultra Dry 100 Q

A partir de la hidrólisis ácida (HCl 18%, 2h) de Ultra Dry 100 Q se obtuvo un rendimiento del 39% de producto de hidrólisis. Este resultado significó una mejoría en el contenido neto de sapogeninas y una disminución del tiempo de hidrólisis en 1 hora, ya que cuando se usaba HCl al 9% y calentamiento a reflujo por 3 horas se obtenía un rendimiento de un 30 % de producto de hidrólisis.

#### 6.1.2. Aislamiento de sapogeninas

**A) CC Sil-A:** fraccionamiento del producto de hidrólisis en CC de sílica gel.

16,7 g de sapogeninas (provenientes de la hidrólisis de 42,8 g de Ultra Dry 100 Q) se fraccionaron en 3 CC rápidas secas de sílica gel G-60 (0,063-0,2 mm) bajo condiciones idénticas:

- Volumen de eluyente: 200 mL de fase móvil.
- Cabeza: 1,4 cm (5,57 g muestra + 6,0 g sílica gel).
- Cuerpo: 11,6 cm.
- Diámetro columna: 4 cm.
- Composición de fase móvil: ver **tabla 2**

**Tabla 2:** Composición y fracciones obtenidas de la CC Sil-A

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

Las fracciones obtenidas en la CC Sil-A se unieron en una, según su similitud en la CCF y se rotavaporaron. En base a esto, se obtuvieron fracciones de distinta polaridad:

- **Pol-1:** Fracciones de polaridad más baja (fracciones 1-5).
- **Pol-2:** Fracciones de polaridad media-baja (fracciones 6-8d).

- **Pol-3:** Fracciones de polaridad media (fracciones 9-16).
- **Pol-4:** Fracciones de polaridad media- alta (fracciones 17-21).
- **Pol-5:** Fracciones de polaridad alta (fracciones 22-25).

**B) CC Sil-B:** Fraccionamiento de Pol-2 en CC de sílica gel.

A 6,9 g de Pol-2 se les realizó una nueva columna rápida seca de sílica gel G-60 (0,063-0,2 mm). Las condiciones fueron:

- Volumen de eluyente: 100 mL de fase móvil
- Cabeza: 0,9 cm (3,37g de sílica + 6,9 g Pol-2).
- Cuerpo: 14,5 cm (95 g).
- Diámetro: 4,5 cm aprox.
- Composición de la fase móvil: ver **tabla 3**

**Tabla 3:** Composición y fracciones obtenidas de la CC Sil-B

Número de fracción	Fase móvil
1-4	Diclorometano 100%
5-12	Diclorometano: acetato de etilo 95:5
13-67	Diclorometano: acetato de etilo 90:10
68-69	Diclorometano: acetato de etilo 85:15
70-73	Diclorometano: acetato de etilo 80:20
74-82	Diclorometano: acetato de etilo 75:25
83-89	Diclorometano: acetato de etilo 70:30
90-93	Diclorometano: acetato de etilo 65:35
94-103	Diclorometano: acetato de etilo 60:40
104	Diclorometano: acetato de etilo 55:45
105	Diclorometano: acetato de etilo 50:50
106	Diclorometano: acetato de etilo 45:55
107	Diclorometano: acetato de etilo 35:65
108-109	Acetato de etilo 100%
110	Metanol 100%

Dentro de todas las fracciones obtenidas, aquellas entre la 50 y la 55 fueron las que demostraron mayor cantidad de sólidos y presentaron similares perfiles cromatográficos según CCF. De éstas, se realizó una CC de Sephadex® con las fracciones N° 53 y 54.

**B1) CC Seph-B1:** Fraccionamiento de Sil-B en CC de Sephadex®.

Las fracciones 53 y 54 obtenida de la columna Sil-B se pasaron por una columna de Sephadex®.

En forma aproximada, las fracciones 38 a 50 obtenidas de esta CC Seph-B1 presentaron un compuesto mayoritario que a la CCF muestra un Rf de 0,76 y color azul al revelar con p-anisaldehído sulfúrico en caliente. Estas fracciones se reunieron para realizar un nuevo procedimiento (ver CC Seph-B3 más abajo).

Las fracciones 83 a 100 obtenidas en esta CC Seph-B1 presentaron un sólido (**Qy1**: 195 mg) de Rf y color idéntico a un patrón de ácido quillaico (Rf: 0,73; color morado) según CCF. Al cristalizar, se observó un compuesto de color blanco en forma de agujas muy delgadas que fue muy soluble en acetato de etilo.

**B2) CC Seph-B2:** fraccionamiento de Sil-B en CC de Sephadex®.

A las fracciones 78-108 de la columna **Sil-B** se les realizaron sucesivas CC de Sephadex®.

Entre las fracciones 71 a 86 de **Seph-B2** se obtuvieron 17 mg de un sólido transparente (**Qy2**) que cristalizó en forma de agujas finas. En la CCF presentó color lila y Rf de 0,18. Fue poco soluble en acetato de etilo y acetona, mientras que fue más soluble en metanol.

**B3) CC Seph-B3:** Lavado y fraccionamiento de Seph-B1 en CC de Sephadex®.

Las fracciones 38 a 50 (110 mg) provenientes de Seph-B1 se lavaron con pequeñas porciones de una mezcla de hexano: diclorometano: metanol 6: 2: 1 en un papel Whatman 54 para retener el sólido. Luego, éste se lavó en un tubo de ensayo con pequeñas porciones de metanol hasta que el sobrenadante apareció incoloro. El sólido remanente se secó y se pasó por una CC de Sephadex®.



Entre las fracciones 50 a 57 de esta columna, se apreció un sólido blanco amorfo (**Qy3**: 43 mg) con Rf de 0,76 y color azul al revelar con p-anisaldehído sulfúrico en caliente. Este compuesto fue poco soluble en metanol y acetato de etilo, y un poco más soluble en cloroformo.

C) **CC Sil-C**: fraccionamiento de Pol-3 en CC de sílica gel.

A 3,3 g de Pol-3 se les realizó una nueva CC rápida seca de sílica gel G-60 (0,040-0,063 mm). Las condiciones fueron:

- Volumen aproximado de eluyente: 50 mL de fase móvil.
- Cuerpo columna: 12 cm de altura.
- Cabeza: 1 cm de altura (muestra 3,3 g más silicagel 3 g).
- Diámetro de la columna: 3,7 cm.
- Composición de fase móvil: ver **tabla 4**.

**Tabla 4:** Composición y fracciones obtenidas de la CC Sil-C

Número de fracción	Fase móvil
1-14	Diclorometano: acetato de etilo 80:20
15-42	Diclorometano: acetato de etilo 70:30
43-46	Diclorometano: acetato de etilo 60:40
47-50	Diclorometano: acetato de etilo 50:50
51-54	Diclorometano: acetato de etilo 40:60
55-70	Diclorometano: acetato de etilo 30:70
71-78	Diclorometano: acetato de etilo 20:80
79-82	Diclorometano: acetato de etilo 10:90
83-98	Acetato de etilo 100%
99-106	Metanol 100%

Las fracciones con un perfil común en CCF obtenidas de esta columna se reunieron y se rotavaporaron para realizar nuevas CC de Sephadex®.

**C1) CC Seph-C1:** fraccionamiento de Sil-C en CC de Sephadex®.

Las fracciones 2-11 de la columna Sil-C se reunieron y se les realizó una CC de Sephadex®.

Entre las fracciones 59-76 se obtuvo el mismo compuesto puro denominado **Qy1** (213 mg).

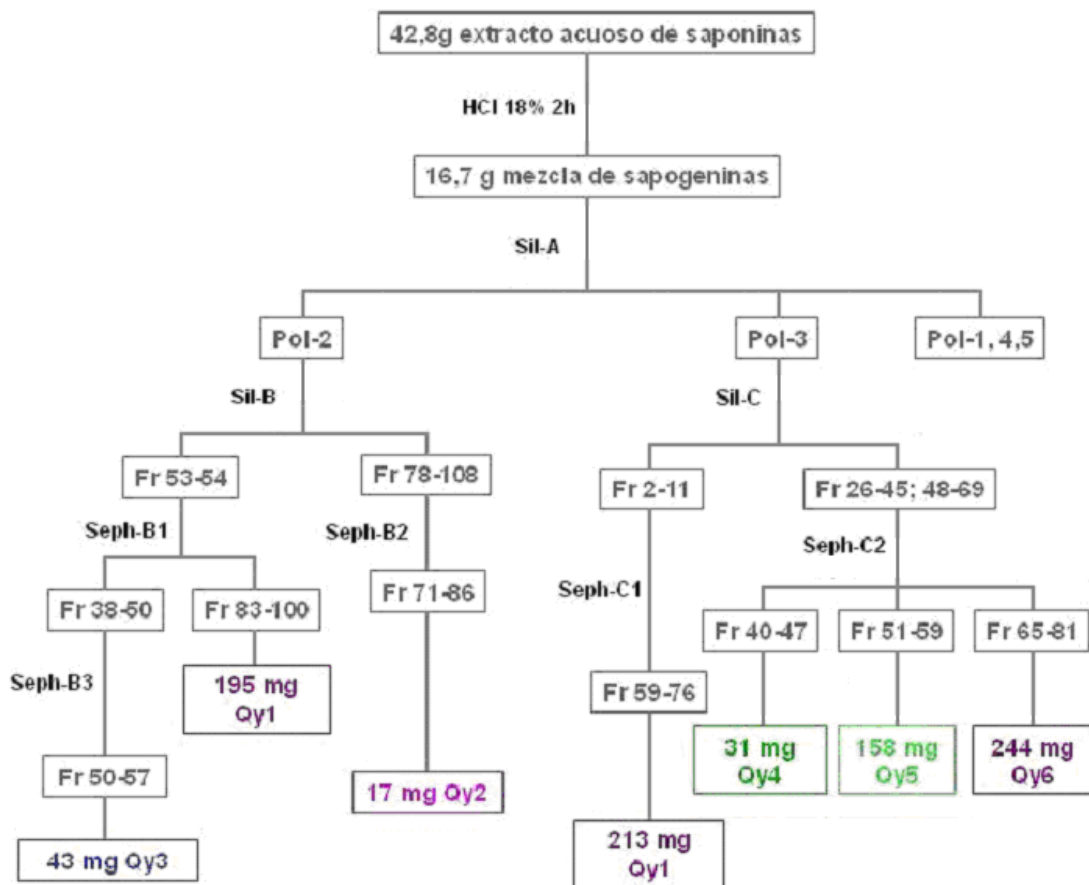
**C2) CC Seph-C2:** fraccionamiento de Sil-C en CC de Sephadex®.

Se juntaron las fracciones 26-45 y 48-69 de Sil-C para realizar una CC de Sephadex® con ellas.

Como indica la **tabla 5**, se aislaron 3 sapogeninas:

**Tabla 5:** Sapogeninas aisladas a partir de CC Seph-C2 y sus principales características

<b>Fracción aproximada</b>	<b>Nombre</b>	<b>Color y Rf en CCF</b>	<b>Características físicas y fisicoquímicas</b>	<b>Cantidad</b>
40-47	<b>Qy4</b>	Verde agua; 0,50.	Sólido amorfo color blanco amarillento. Poco soluble en disolventes orgánicos, un poco más soluble en MeOH.	31 mg
51-59	<b>Qy5</b>	Verde pistacho idéntico a un patrón de ácido fitolacagénico; 0,47.	Sólido amorfo color blanco; cristales blancos en forma de aguja. Muy soluble en MeOH.	158 mg
65-85	<b>Qy6</b>	Morado; 0,54.	Cristales transparentes en forma de aguja; cristales rectangulares. Muy soluble en MeOH.	244 mg



**Figura 3:** Esquema del fraccionamiento del extracto acuoso Ultra Dry 100-Q y obtención de las sapogeninas

### 6.1.3. Determinación estructural<sup>1,2</sup>

Qy1 se identificó como ácido quillaico (ácido 3 $\beta$ , 16 $\alpha$ -dihidroxi-23oxoolean-12-en-28-oico).

En el MS de ionización química se observó que  $[M-H]^- = 485,44$  (ver **Anexo G1**); por lo que el peso molecular (PM) para  $C_{30}H_{45}O_5$  correspondió a 486,33064 g/mol.

En el espectro de  $^1\text{H}$ -RMN, a  $\delta$  9,77 se observó un singlete correspondiente al aldehído en C-23. Además, se pudo apreciar una señal a  $\delta$  5,35 correspondiente al protón vinílico (H-12) y las señales características de los grupos metilos entre  $\delta$  0,91 y  $\delta$  1,65.

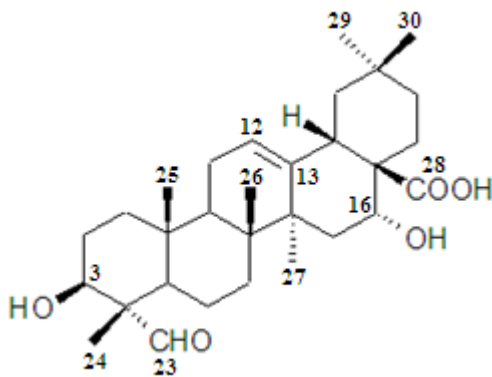
....El doble de doblete a  $\delta$  3,80 se asignó al protón geminal del grupo hidroxilo en C-3 y la señal a  $\delta$  4,46 al H-16 geminal del grupo hidroxilo en dicha posición.

En el espectro de  $^{13}\text{C}$ -RMN se observaron señales a  $\delta$  208,5 para el carbono del aldehído y una señal a  $\delta$  181,1 para el carbono del carboxilo en posición 28. Además, aparecieron las señales para los carbonos 12 y 13, a  $\delta$  123,1 y  $\delta$  145,2; respectivamente.

También se han identificado las señales de los carbonos unidos a hidroxilos a  $\delta$  75,21 (C-16) y a  $\delta$  72,78 (C-3). A  $\delta$  56,76 apareció una señal característica para el carbono en posición 4.

Por otra parte, se identificaron 6 singletes correspondiente a los metilos 24, 25, 26, 27, 29 y 30 en  $\delta$  9,40; 16,20; 17,70; 26,70; 33,45 y 24,88; respectivamente.

En la **tabla 6** se muestra la comparación de los espectros de RMN del ácido quillaico descritos en la literatura (Nyberg *et al.*, 2000) comparado con los valores espectrales obtenidos de Qy1 aislado en nuestro Laboratorio, mientras que en la **figura 4** se muestra la estructura propuesta para Qy1.



**Figura 4:** Estructura química propuesta para Qy1

<sup>1</sup>Para mayores detalles de numeración, véase la figura 2

<sup>2</sup>Los espectros de RMN se encuentran en en los Anexos C-F

**Tabla 6:** Comparación de los espectros RMN del ácido quillaico versus Qy1

Nº C	<sup>1</sup> H-RMN ácido quillaico (δ) <sup>a</sup>	<sup>13</sup> C-RMN ácido quillaico (δ) <sup>a</sup>	<sup>1</sup> H-RMN Qy1 (δ) <sup>b</sup>	<sup>13</sup> C-RMN Qy1 (δ) <sup>b</sup>
1	1,11; 1,72	38,90	11,1; 1,72 (d J = 5,9 Hz) *	39,43
2	1,79; 1,98	25,40	1,79; 1,94*	27,89*
3	3,86	85,70	3,80 (dd J = 5,4 Hz; 9,5 Hz)	72,78
4	-	56,00	-	56,76
5	1,33	48,90	1,36 (dd J = 3,5 Hz; 14,8 Hz)	49,51
6	0,95; 1,47	21,00	*	21,75
7	1,29;1,54	33,30	*	33,55*
8	-	40,80	-	40,93
9	1,75	47,60	1,75	48,02*
10	-	37,00	-	36,96
11	1,93; 1,93	24,30	1,93 (d J = 3,5 Hz) 1,95 (d J = 3,5 Hz)*	24,42
12	5,33	122,80	5,35 (t J = 3,4 Hz)	123,10
13	-	144,60	-	145,20
14	-	42,40	-	42,70
15	1,41; 1,74	36,10	1,79 (d J = 4,4 Hz)*	36,15
16	4,45	74,60	4,46 (t J = 4,4 Hz; 2,9 Hz)	75,21
17	-	-	-	59,75*
18	2,93	41,90	3,01 (dd J = 4,1 Hz; 14,2 Hz)	42,04
19	1,05; 2,30	47,80	1,07 (d J = 5,6 Hz) 2,23 (d J = 14,2 Hz)*	47,69*
20	-	31,00	-	31,41
21	1,19; 1,96	36,10	*	36,55
22	1,84;1,83	31,60	1,83 (m)	32,78
23	9,44	210,80	9,33 (s)	208,50
24	1,17	10,60	1,10 (s)	9,40
25	1,02	16,30	1,04 (s)	16,20
26	0,81	17,60	0,84 (s)	17,70
27	1,4	26,90	1,40 (s)	26,95
28	-	177,00	-	181,10
29	0,89	33,00	0,88 (s)	33,45*
30	0,97	24,70	0,95 (s)	24,88

<sup>a</sup> Nyberg *et al.* (2000) en CD<sub>3</sub>OD a 400 MHz

\* Valores bajo revisión

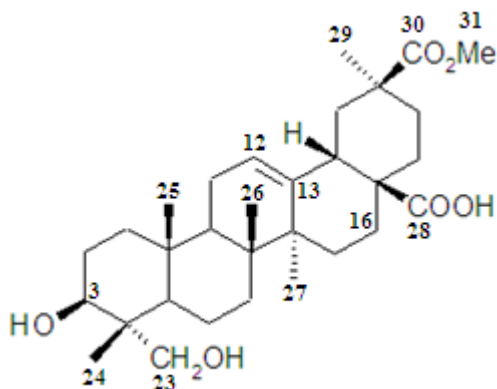
<sup>b</sup>Valores obtenidos para el compuesto Qy1 en CD<sub>3</sub>OD-CDCl<sub>3</sub> a 500 MHz

El compuesto Qy5 fue caracterizado como ácido fitolacagénico (ácido 3β,23-dihidroxi-30-metilcarbonilolean-12-en-28-oico) y su PM, según MS, fue de 516.709 g/mol ([M+Na]=539,33340) (ver **Anexo G2**). Su fórmula estructural correspondió a C<sub>31</sub>H<sub>48</sub>O<sub>6</sub>.

En el espectro de <sup>1</sup>H-RMN no se visualizó el grupo aldehído, aunque se apreció la presencia del protón vinílico a δ 5,30 y el doble de doblete del protón geminal al grupo hidroxilo en C-3 a δ 3,60. Además se pudo apreciar el desapantallamiento de los protones unidos a C-23 por efecto del hidroxilo a δ 3,29 y δ 3,52. También aparecieron los 6 singuletes atribuibles a grupos metilos en los carbonos 24, 25, 26, 27, 29 y 31, a δ 0,8; δ 1,18; δ 0,69; δ 0,97; δ 1,13 y δ 3,59; respectivamente.

En el espectro de <sup>13</sup>C-RMN se observaron 31 señales, dos de las cuales correspondieron a carbonos carboxílicos (a δ 181,30 y δ 178,78). Además aparecieron las señales para los carbonos 12 y 13, a δ 124,26 y δ 144,82; correspondientemente. Otras dos señales características se advirtieron a δ 73,81 y δ 67,23 debido a los carbonos hidroxílicos C-3 y C-23, respectivamente. En tanto, los peaks atribuibles a los metilos 24, 25, 26, 27, 29 y 31 aparecieron a δ 14,45; 16,28; 17,05; 26,38; 28,70 y 52,32; respectivamente.

En la **tabla 7** se muestra la comparación de los espectros de RMN del ácido fitolacagénico descritos en la literatura (Guo y Kenne, 2000) comparado con los valores espectrales obtenidos de Qy5 aislado en nuestro Laboratorio, mientras que en la **figura 5** se muestra la estructura propuesta para Qy5.



**Figura 5:** Estructura química propuesta para Qy5

**Tabla 7:** Comparación de los espectros RMN del ácido fitolacagénico versus Qy5

Nº C	<sup>1</sup> H-RMN ácido fitolacagénico (δ) <sup>a</sup>	<sup>13</sup> C-RMN ácido fitolacagénico (δ) <sup>a</sup>	<sup>1</sup> H-RMN Qy5 (δ) <sup>b</sup>	<sup>13</sup> C-RMN Qy5 (δ) <sup>b</sup>
1	0,99; 1,64	39,4	*	39,48
2	1,93; 1,77	26	*	27,42
3	3,64	83,60	3,60 (dd J = 4,4 Hz; 11,5 Hz)	73,81
4		44,20	-	43,33
5	1,23	48,20	0,65-1,25	48,72
6	1,36; 1,51	18,70	*	19,06
7	1,61; 1,36	33,30	*	33,47
8		40,70	-	40,45
9	1,64	48,90	1,77 (dd J = 4,1 Hz; 13,7 Hz)	48,49
10		37,60	-	37,91
11	1,93; 1,92	24,50	1,99 (dd J = 3,7 Hz; 13,7 Hz)	24,49
12	5,34	124,00	5,30 (t J = 3,7 Hz)	124,20
13		144,50	-	144,80
14		43,20	-	45,02
15	1,65; 1,21	28,90	*	28,86
16	2,08; 1,71	24,20	*	24,22
17		47,40	-	47,01
18	2,74	43,40	2,69 (dd J = 4,1 Hz; 13,4 Hz)	43,97
19	1,95; 1,72	43,20	*	43,29
20		44,90	-	42,82
21	2,03; 1,40	31,20	*	31,30
22	1,67; 1,67	34,10	*	35,02
23	3,27; 3,75	64,90	3,52 (d J = 10,7 Hz) 3,29 (d J = 10,7 Hz)	67,22
24	0,73	13,20	0,80 (s)	14,45
25	0,98	24,80	1,18 (s)	16,28
26	0,81	17,80	0,69 (s)	17,05
27	1,19	26,00	0,97 (s)	26,38
28		177,60	-	178,80
29	1,14	28,40	1,13 (s)	28,70
30		178,90	-	181,30
31(OMe)	3,73	52,3	3,59 (s)	52,32

<sup>a</sup> Guo y Kenne (2000) en CD<sub>3</sub>OD a 600 MHz.

\* Valores bajo revisión.

<sup>b</sup>Valores obtenidos para el compuesto Qy5 en CD<sub>3</sub>OD a 500 MHz.

El compuesto Qy6 correspondió a un isómero del ácido quillaico (ácido 3 $\beta$ , 16 $\alpha$ -dihidroxi-23-oxoolean-13 (18)-en-28-oico). Por MS de ionización química se determinó que su PM fue de 486 g/mol (ver **Anexo G3**). Según la ionización por impacto electrónico (ver **Anexo G4**), sus principales fragmentos correspondieron a los m/z de 486; m/z: 441 (pérdida de un COOH); m/z: 424 (pérdida de COOH y OH); m/z: 409 (pérdida de COOH, OH y CH<sub>3</sub>) y m/z: 391 (pérdida de COOH, OH, CH<sub>3</sub> y H<sub>2</sub>O). No se apreciaron reacciones tipo retro Diels-Alder, características del doble enlace C-12 y C-13.

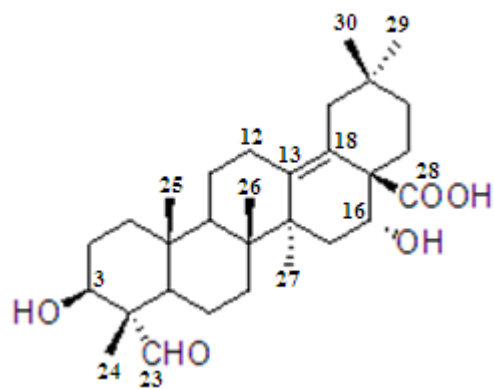
En el RMN de protones se pudo apreciar el singulete típico para el aldehído a  $\delta$  9,28 en C-23; las señales correspondientes a los protones desapantallados ubicados en el mismo carbono de los hidroxilos en C-3 y C-16 (a  $\delta$  3,67 y  $\delta$  4,06; respectivamente); y los 6 singuletes correspondientes a los metilos 24, 25, 26, 27, 29 y 30 a  $\delta$  0,88; 0,87; 0,68; 1,19; 0,81 y 0,82; respectivamente. No se apreció la señal característica del protón en C-12, sin embargo, se observó un doble enlace en el C<sub>13</sub>-RMN a  $\delta$  128,2 y 137,7; indicando que está absolutamente sustituido. En base al espectro HMBC y a que en el MS no se presentó el rompimiento tipo retro Diels- Alder, se dedujo que el doble enlace se encuentra entre C-13 y C-18.

Otras señales importantes en la espectroscopía de C<sub>13</sub>-RMN fueron la presencia del aldehído en C-23 y la del carboxilo en C-28 debido a las señales a  $\delta$  208,8 y a  $\delta$  177,7; respectivamente.

En tanto, los carbonos hidroxílicos presentaron señales a  $\delta$  71,90 y  $\delta$  72,92; mientras que los metilos 24, 25, 26, 27, 29 y 30 aparecieron a  $\delta$  9,30; 17,52; 19,60; 26,34; 25,25 y 33,15, correspondientemente.

En la **tabla 8** se muestran los valores de RMN obtenidos de Qy6 aislado en nuestro Laboratorio, mientras que en la **figura 6** se muestra la estructura propuesta para Qy6.





**Figura 6:** Estructura química propuesta para Qy6

**Tabla 8:** Señales de  $^1\text{H}$  y  $^{13}\text{C}$ -RMN para el compuesto Qy6

Nº C	$^1\text{H}$ -RMN Qy6 ( $\delta$ )	$^{13}\text{C}$ -RMN Qy6 ( $\delta$ )
1	*	*
2	*	*
3	3,67 (m)	71,90
4	-	*
5	*	*
6	*	*
7	*	*
8	-	*
9	*	*
10	-	*
11	2,6 (d $J = 13,54$ Hz)	26,86
12	1,6	52,72
13	-	137,70
14	-	*
15	*	*
16	4,06 (dd $J = 9,15$ Hz; 4,21 Hz)	72,92
17	-	*
18	-	128,20
19	2,33 (d $J = 13,91$ Hz); 1,69	43,11
20	-	*
21	*	*
22	*	*
23	9,28 (s)	208,80
24	0,88 (s)	9,30
25	0,87 (s)	17,52
26	0,68	19,60
27	1,19 (s)	26,34
28	-	177,70
29	0,81 (s)	25,25
30	0,82 (s)	33,15

Valores obtenidos para el compuesto Qy6 en  $\text{CD}_3\text{OD}$  a 400 MHz \* Valores bajo revisión

El compuesto Qy3 presentó un peso molecular de 488 g/mol según MS de ionización química (**Ver Anexo G5**).

Dentro del MS de impacto electrónico no se visualizaron reacciones tipo retro Diels-Alder, que son características del doble enlace entre C-12 y C-13.

Luego de disolver Qy3 en  $\text{CDCl}_3$  y someterlo a ensayos espectroscópicos, en el RMN de protones se pudo apreciar el singulete agudo del grupo aldehído a  $\delta$  9,41 y 7 singuletes atribuibles a metilos a  $\delta$  1,06; 1,09; 1,36; 0,85; 1,24; 0,92 y 1,55.

En el espectro de  $\text{C}_{13}$ -RMN se pudo constatar la presencia de 30 señales, dentro de las cuales ninguna correspondió a las vinílicas propias de alguna insaturación, confirmándose la ausencia del doble enlace dentro de toda la estructura triterpénica. Además se confirmó la presencia del aldehído en C-23 y la del carboxilo en C-28 debido a las señales a  $\delta$  207,3 y a  $\delta$  177,7; respectivamente.

Los 7 metilos que aparecieron en el espectro de  $^1\text{H}$ -RMN, se confirmaron mediante DEPT-135 y  $\text{C}_{13}$ -RMN. Las señales correspondientes a ellos aparecieron a  $\delta$  9,02; 18,47; 21,44; 22,96; 33,13; 34,30 y 34,65.

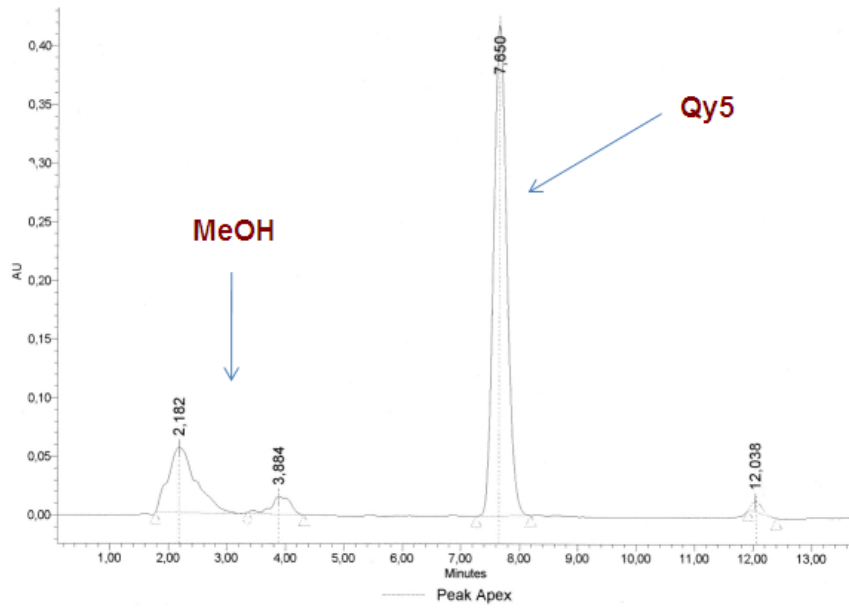
El resto de las señales de esta molécula está en estudio, aunque se postula una lactona triterpénica.

En el caso de Qy2 y Qy4, sus espectros aún están en estudio.

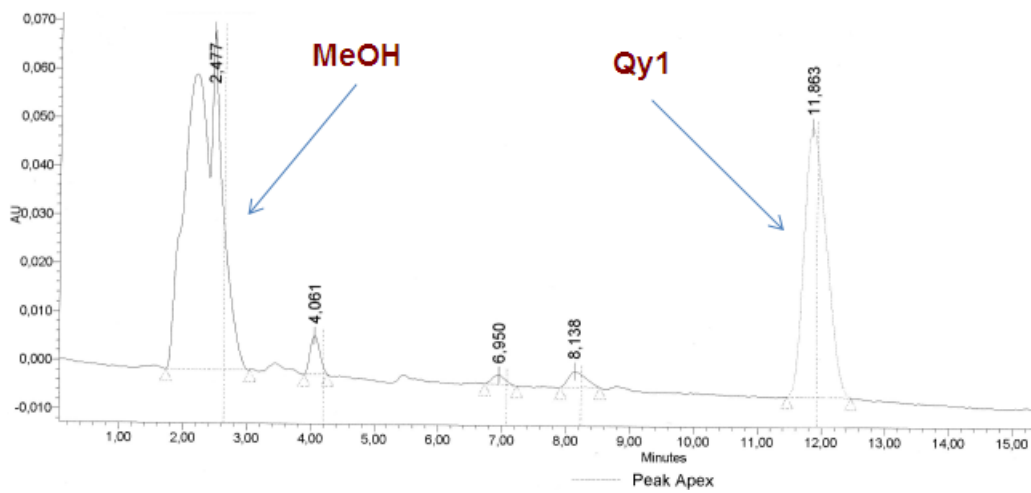
#### **6.1.4. Valoración por HPLC**

El producto de hidrólisis del extracto Ultra Dry 100 Q fue valorado por HPLC en función de su contenido en Qy1 y Qy5.

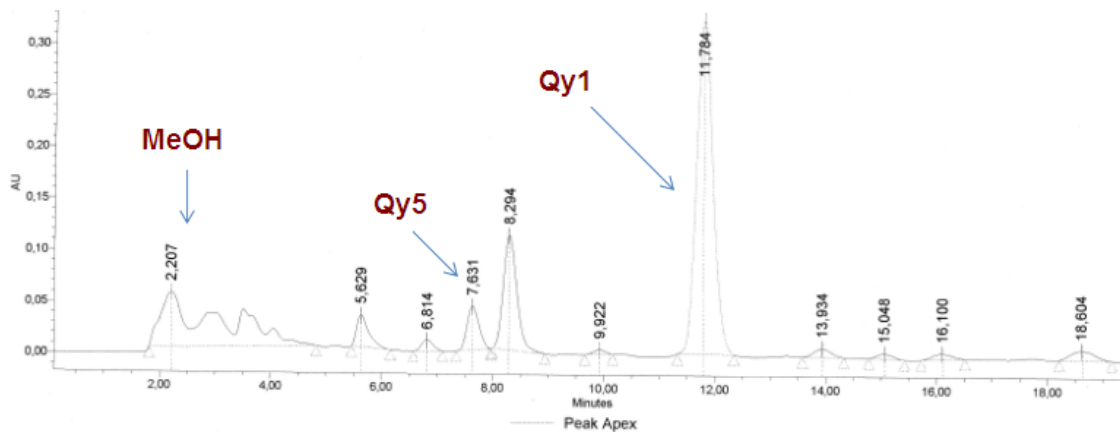
Los tiempos de retención de ambos triterpenoides correspondieron a 11,8 min para Qy1, mientras que para Qy5 fue de 7,6 min, como se adjunta a continuación:



**Figura 7:** Cromatograma HPLC para Qy5 (580 ppm en MeOH 100% a 201 nm)



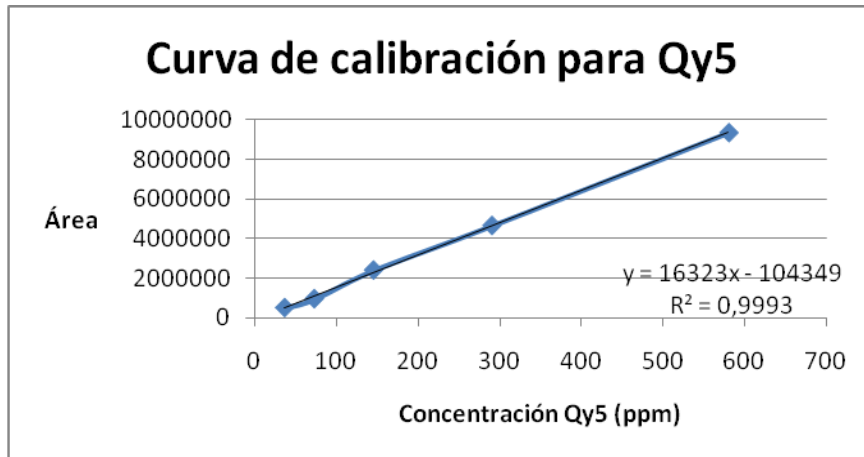
**Figura 8:** Cromatograma HPLC para Qy1 (480 ppm en MeOH 100% a 201 nm)



**Figura 9:** Cromatograma HPLC para el producto de hidrólisis (407 ppm en MeOH 100% a 201 nm)

**Tabla 9:** Datos de la curva de calibración para Qy5 (valores de concentración vs. área)

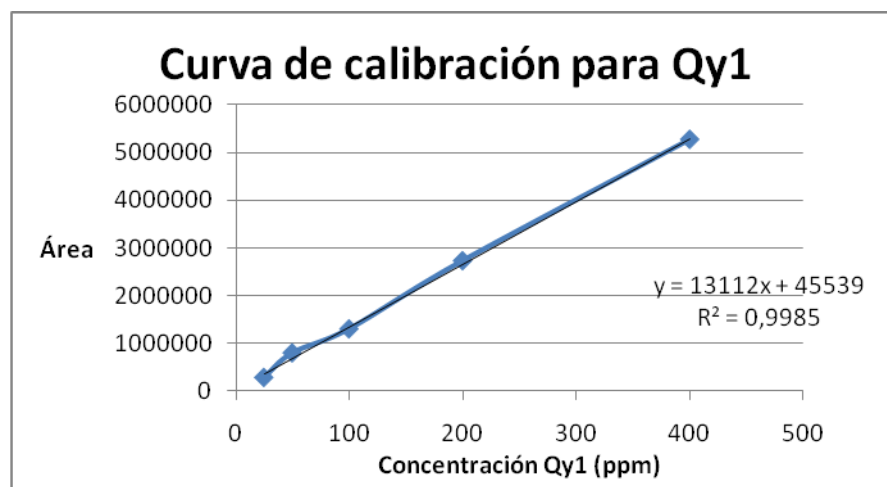
Concentración Qy5 (ppm)	Área
36,25	495738
72,5	946657
145	2394685
290	4647014
580	9337103



**Figura 10:** Curva de calibración para Qy5: valores de concentración vs área

**Tabla 10:** Datos de la curva de calibración para Qy1 (valores de concentración vs. área)

Concentración Qy1 (ppm)	Área
25	288611
50	802624
100	1303955
200	2728611
400	5266061



**Figura 11:** Curva de calibración para Qy1: valores de concentración vs área

Como el peso del producto de hidrólisis correspondió a 8,5 mg (en 10 mL de solución), tenemos que:

Para Qy1, el área en el producto de hidrólisis correspondió a 813117. Este valor fue obtenido de una solución de 1 mL de dicho producto a 0,085 mg/mL (diluyendo 10 veces la solución inicial de 0,85 mg/mL). Si se reemplaza el valor de área en la curva de calibración de la **figura 11**, se considera aquella dilución, y que los 8,5 mg de producto de hidrólisis son el 100%, se llega a la conclusión de que Qy1 está presente en un 68,9% dentro de dicho producto.

En el caso de Qy5 no se realizó ninguna dilución, por lo que el valor de su área (595101) fue reemplazado en la curva de calibración de la **figura 10**. También se consideró que los 8,5 mg de producto de hidrólisis correspondieron al 100%. En base a estos parámetros, el contenido de Qy5 correspondió a un 5,0 % dentro del producto de hidrólisis.

## **6.2. Ensayo de inhibición de la GPa**

Se evaluó el producto de hidrólisis y 4 sapogeninas aisladas como potenciales inhibidores de la GPa y se procesaron los datos según el punto **5.2**.

Es importante notar que el producto de hidrólisis (a 2,7 mg/mL, la concentración más alta sin precipitar) sólo alcanzó una inhibición máxima de la GPa del  $16,8 \pm 3,3$  %, mientras que las sapogeninas mostraron diferentes grados de inhibición como indica la **tabla 11**. Por otra parte, la **tabla 12** ilustra el % I de la cafeína, molécula inhibitoria de referencia para el ensayo de la GPa.

En las **figuras 12 a 15** se muestran todos los gráficos de **% inhibición de la GPa** vs el **logaritmo de la concentración**, tanto de las sapogeninas evaluadas como los de la **cafeína**.

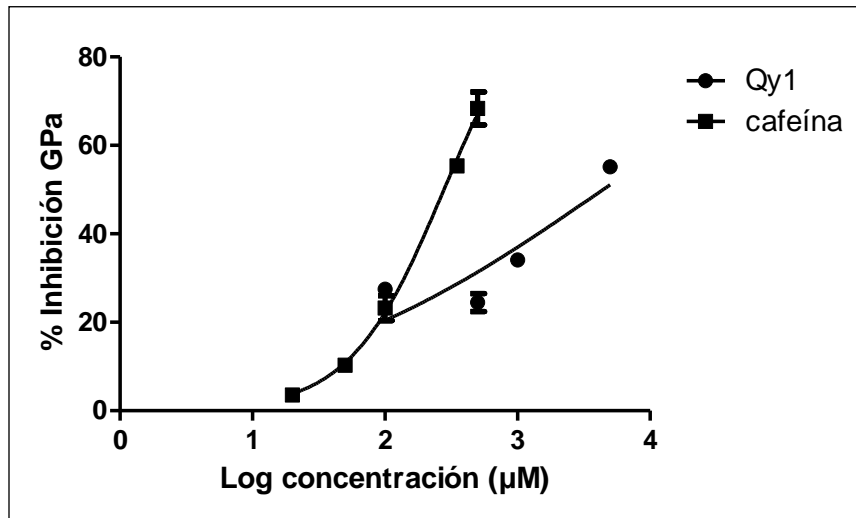
**Tabla 11:** %I de las sapogeninas de quillay a distintas concentraciones ( $\mu\text{M}$ )

<b>Qy1 (<math>\mu\text{M}</math>)</b>	<b>5000</b>	<b>1000</b>	<b>500</b>	<b>100</b>
<b>Acorr 1</b>	0,277	0,406	0,464	0,436
<b>Acorr 2</b>	0,265	0,385	0,436	0,449
<b>Acorr 3</b>	0,275	0,411	0,477	0,437
<b>Prom CN</b>	0,608	0,608	0,608	0,608
<b>Prom % I</b>	55,2 $\pm$ 1,1	34,1 $\pm$ 2,3	24,5 $\pm$ 3,4	27,5 $\pm$ 1,2
<b>Qy3 (<math>\mu\text{M}</math>)</b>	<b>5000</b>	<b>1000</b>	<b>500</b>	<b>100</b>
<b>Acorr 1</b>	0,096	0,47	0,543	0,58
<b>Acorr 2</b>	0,128	0,425	0,527	0,597
<b>Acorr 3</b>	0,121	0,452	0,516	0,601
<b>Prom CN</b>	0,623	0,623	0,623	0,623
<b>Prom % I</b>	81,5 $\pm$ 2,7	27,9 $\pm$ 3,6	15,1 $\pm$ 2,2	4,8 $\pm$ 1,8
<b>Qy5 (<math>\mu\text{M}</math>)</b>	<b>6400</b>	<b>3000</b>	<b>500</b>	<b>100</b>
<b>Acorr 1</b>	0,293	0,421	0,707	0,694
<b>Acorr 2</b>	0,289	0,391	0,722	0,711
<b>Acorr 3</b>	0,293	0,406	0,702	0,656
<b>Prom CN</b>	0,585	0,585	0,757	0,757
<b>Prom % I</b>	50,1 $\pm$ 0,4	30,6 $\pm$ 2,6	6,1 $\pm$ 1,4	9,2 $\pm$ 3,7
<b>Qy6 (<math>\mu\text{M}</math>)</b>	<b>5000</b>	<b>1000</b>	<b>500</b>	<b>100</b>
<b>Acorr 1</b>	0,378	0,668	0,661	0,674
<b>Acorr 2</b>	0,424	0,646	0,666	0,658
<b>Acorr 3</b>	0,386	0,637	0,664	0,687
<b>Prom CN</b>	0,752	0,752	0,752	0,752
<b>Prom % I</b>	47,3 $\pm$ 3,3	13,5 $\pm$ 2,1	11,7 $\pm$ 0,3	10,5 $\pm$ 1,9

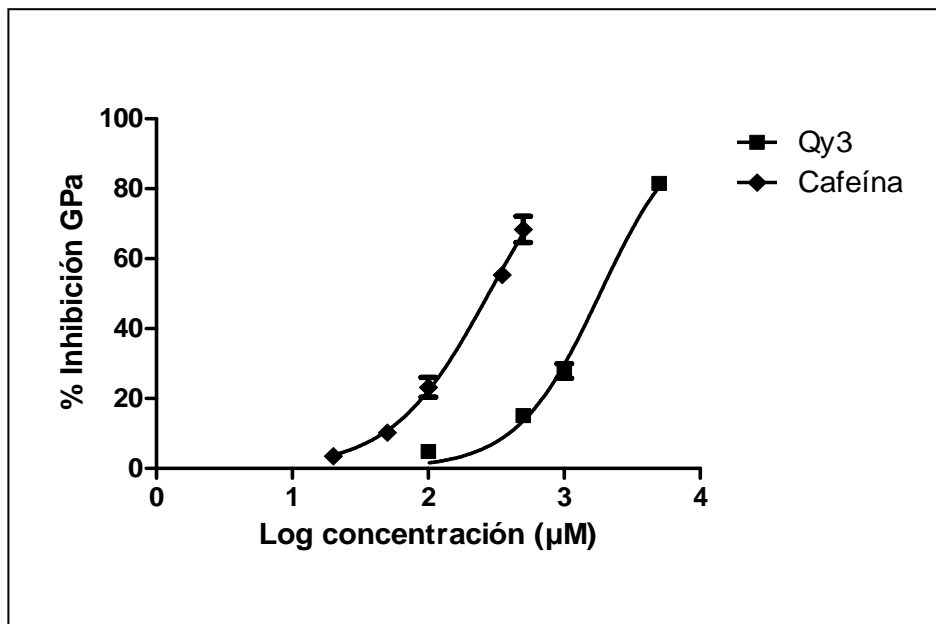
**Tabla 12:** %I de la cafeína a distintas concentraciones ( $\mu\text{M}$ )

<b>Cafeína (<math>\mu\text{M}</math>)</b>	<b>500</b>	<b>350</b>	<b>100</b>	<b>50</b>	<b>20</b>
<b>Acorr 1</b>	0,200	0,312	0,522	0,600	0,665
<b>Acorr 2</b>	0,187	0,302	0,569	0,628	0,67
<b>Acorr 3</b>	0,270	0,313	0,504	0,634	0,668
<b>Prom CN</b>	0,692	0,692	0,692	0,692	0,692
<b>Prom % I</b>	68,4 $\pm$ 6,4	55,4 $\pm$ 0,9	23,2 $\pm$ 4,8	10,4 $\pm$ 2,6	3,6 $\pm$ 0,4





**Figura 12:** Efecto inhibitorio de Qy1 y cafeína sobre la GPa



**Figura 13:** Efecto inhibitorio de Qy3 y cafeína sobre la GPa

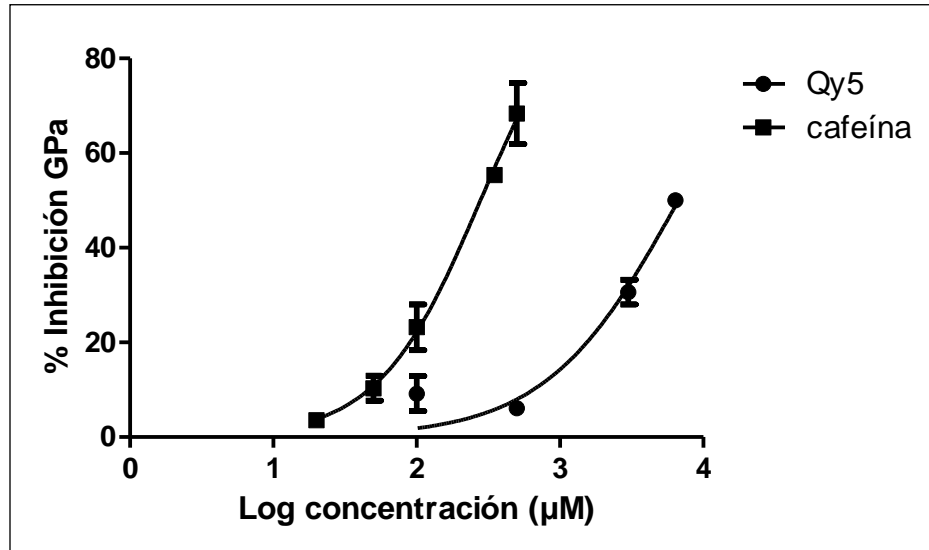


Figura 14: Efecto inhibitorio de Qy5 y cafeína sobre la GPa

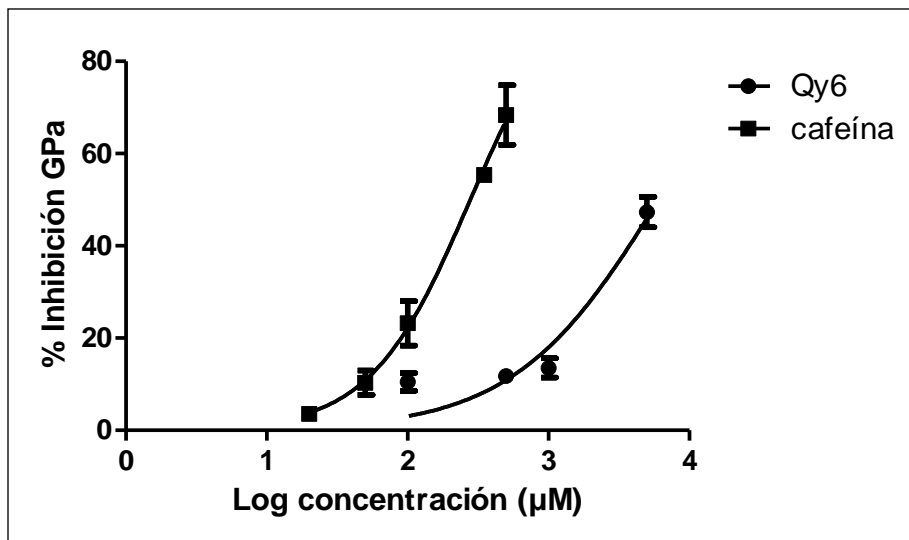


Figura 15: Efecto inhibitorio de Qy6 y cafeína sobre la GPa

**Tabla 13:** Resumen de los principales parámetros evaluados en las muestras utilizadas en el ensayo de la GPa

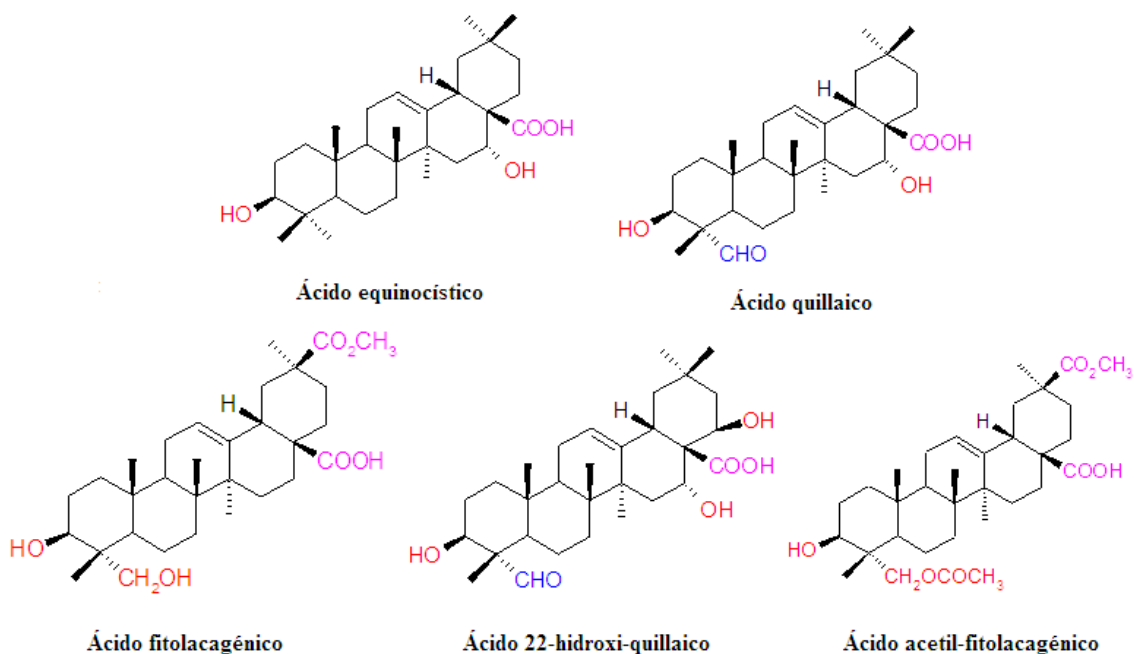
	<b>IC<sub>50</sub> (μM)</b>	<b>% Inhibición Máxima (%I máx)</b>	<b>R<sup>2</sup></b>
<b>Cafeína</b>	278,8± 21,1	68,4 ± 6,4	0,9835
<b>Qy1</b>	4411,0± 922,3	55,2 ± 1,1	0,7686
<b>Qy3</b>	1836,0± 35,1	81,5 ± 2,7	0,9898
<b>Qy5</b>	6707,0± 572,4	50,1 ± 0,4	0,9409
<b>Qy6</b>	6072,0± 1428,8	47,3 ± 3,3	0,9055
<b>Producto de hidrólisis</b>	Muy alto	16,8 ± 3,3	-

## VII. DISCUSIÓN

### 7.1. Parte química

En base a las estructuras químicas aisladas e identificadas completamente, como Qy1 (ácido quillaico), Qy5 (ácido fitolacagénico), Qy6 (ácido 3 $\beta$ , 16 $\alpha$ -dihidroxi-23-oxoolean-13 (18)-en-28-oico) y la estructura parcialmente descrita de Qy3, podemos afirmar que sólo las dos primeras corresponden a estructuras que forman parte de las saponinas de la corteza de quillay descritas anteriormente en la bibliografía (Nyberg *et al.*, 2003; Guo y Kenne, 2000; Kite *et al.*, 2004).

Como muestra la **figura 16**, 5 saponeninas han sido descritas por diversos autores: existe acuerdo general en la existencia de 4 de ellas (ácidos quillaico, equinocístico, 22 $\beta$ -hidroxi-quillaico y fitolacagénico), mientras que Kite *et al* (2004) describieron la presencia de ácido fitolacagénico acetilado en O-23.

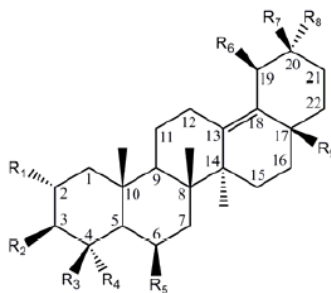


**Figura 16:** Estructuras químicas de las saponeninas descritas en la corteza de quillay

Como puede verse, todas las estructuras reportadas que forman parte de las saponeninas de la corteza de quillay presentaron como característica central el doble enlace en C-12 y C-13 (para

mayores detalles de numeración, véase la **figura 2**), rasgo que no poseían ni Qy3 ni Qy6, por lo que existen dos posibilidades: que Qy3 y Qy6 sean compuestos que no han sido previamente descritos por la literatura y se originan naturalmente, o bien, que sean producto de las condiciones del laboratorio y no existan como tal en la corteza de quillay.

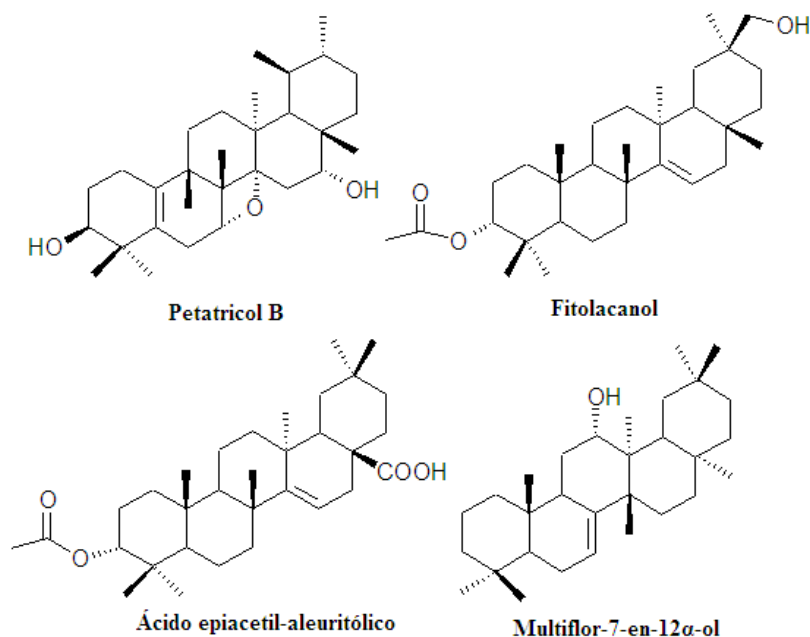
Según la primera premisa, dentro de la naturaleza de los triterpenoides existen muchas moléculas con dobles enlaces que no siguen el patrón clásico de sustitución en la posición C-12 y C-13. Al igual que en la estructura de Qy6, se pueden encontrar unas pocas moléculas naturales derivadas del oleanano que presentan un doble enlace entre C-13 y C-18, como es el caso del centellasapogenol-A, la centella saponina-A y el scheoffoleósido A aislados de *Centella asiática* (ver **figura 17**) (Matsuda *et al.*, 2001; James y Dubery, 2009) o de un olean-13(18)-ene-2 $\beta$ , 3 $\beta$ -diol aislado de *Salvia horminum* L. (*Salvia viridis* L.) (Ulubelen *et al.*, 1977).



R <sub>1</sub>	R <sub>2</sub>	R <sub>3</sub>	R <sub>4</sub>	R <sub>5</sub>	R <sub>6</sub>	R <sub>7</sub>	R <sub>8</sub>	R <sub>9</sub>	C=C	Name
OH	-OH	CH <sub>3</sub>	CH <sub>2</sub> OH	H	H	CH <sub>3</sub>	CH <sub>3</sub>	-COOH	13-18	Centellasapogenol A 2 $\alpha$ ,3 $\beta$ ,23-trihydroxy-olean-13-en-28-oic acid)
OH	OH	CH <sub>3</sub>	CH <sub>2</sub> OH	H	H	CH <sub>3</sub>	CH <sub>3</sub>	COO-glc(1-6) glc(1-4)rha	13-18	Centellasaponin A Scheffoleoside A

**Figura 17:** Triterpenoides naturales que presentan insaturaciones entre C-13 y C-18 aislados de *Centella asiatica*

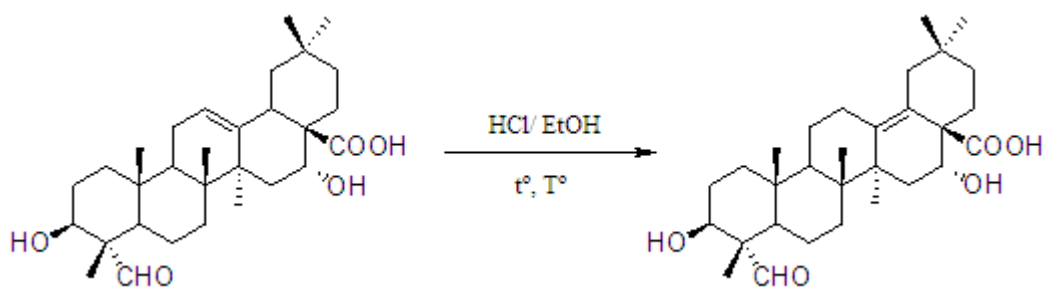
Como muestra la **figura 18**, otros ejemplos de dobles enlaces “poco comunes” son el petatricol B, con una insaturación en los carbonos 5 y 10 de la estructura triterpénica (Xie *et al.*, 2005); algunos taraxer-14-enos que Razdan *et al.*(1982) han aislado de *Phytolacca acinosa*, como el fitolacanol y el ácido epiacetil-aleuritólico; y un triterpenoide aislado de la planta *Wattakaka volubilis*, denominado multiflor-7-en-12 $\alpha$ -ol (Niranjan *et al.*, 2002).



**Fig. 18:** Estructura química de algunos triterpenoides naturales que poseen dobles enlaces distintos a C-12/13

Por otro lado, la segunda premisa indica que el compuesto Qy6 pudiese corresponder a un artefacto, es decir, a un compuesto que se forma bajo distintas circunstancias experimentales y que no existe en la planta como tal. Al analizar la estructura química de Qy6 vemos que es idéntica a Qy1, con la única diferencia que la insaturación en Qy1 está en C-12 y C-13, mientras que en Qy6 está presente en C-13 y C-18. Existen trabajos que reportan un equilibrio catalizado por ácido entre derivados 18 $\alpha$ -olean-12-enos y olean-13(18)-enos (exactamente el mismo caso que se presenta en este análisis), en donde el equilibrio favorece ampliamente a la forma más sustituida, que en este caso es la olean-13(18)-eno (Barton *et al.*, 1968; Brownlie *et al.*, 1956 Davy *et al.*, 1951).

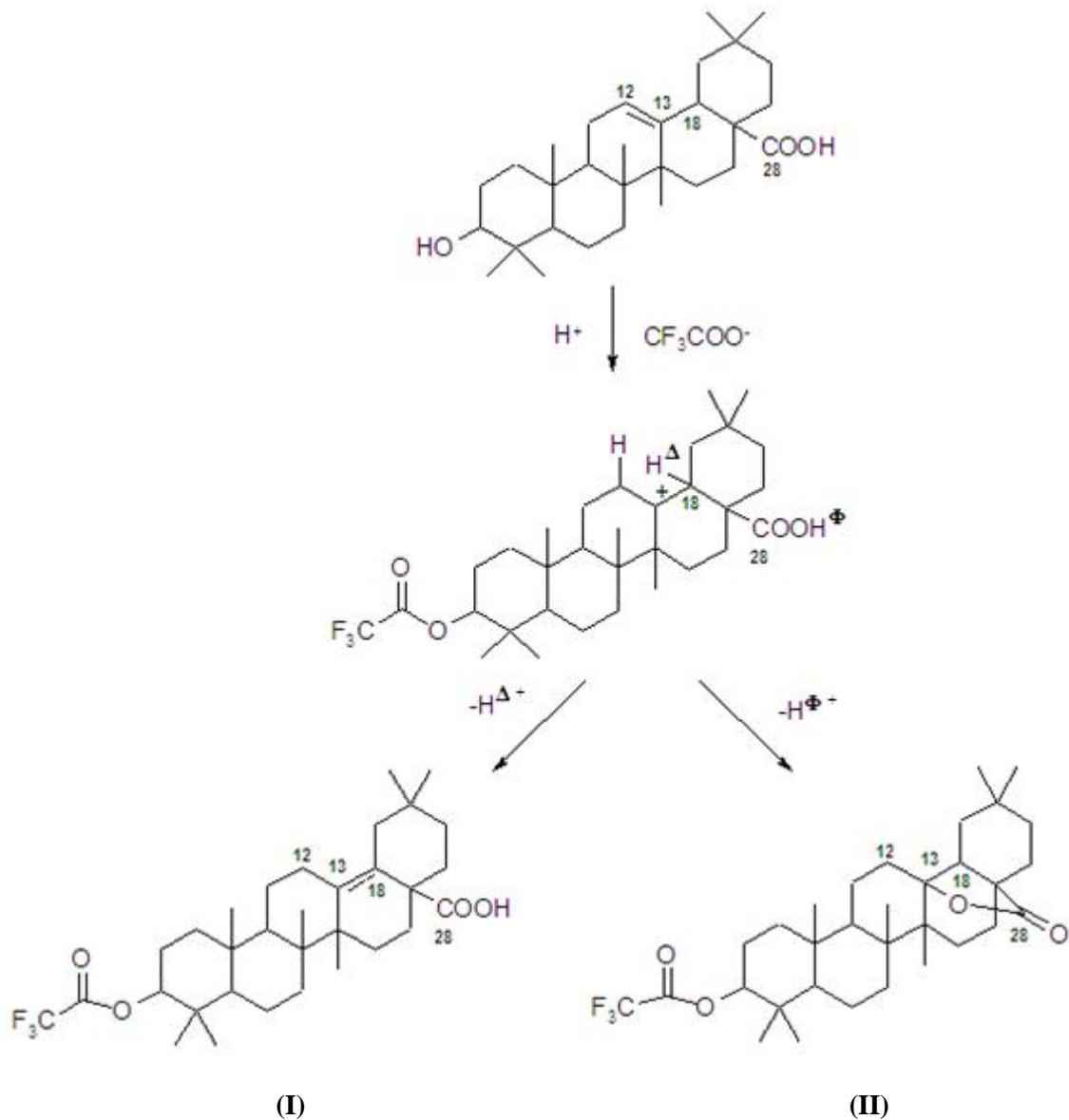
Se ha reportado que tanto el ácido quillaico como el equinocístico obtenido de las saponinas de un extracto de raíz de *Saponaria officinalis* L son fácilmente transformados a sus isómeros olean-13(18)-en-28-oicos gracias a las condiciones de hidrólisis con HCl en etanol acuoso y atmósfera de N<sub>2</sub> (Kubota *et al.*, 1969). El ácido quillaico se degrada en mayor cantidad conforme se aumenta el tiempo de reflujo desde 2,5 a 20 h, convirtiéndose en su mayoría a su isómero olean-13(18)-eno como muestra la **figura 19**:



**Figura 19:** Conversión del ácido quillaico a su isómero olean-13(18)-eno. La reacción ocurre en HCl y etanol acuoso bajo atmósfera de N<sub>2</sub> y reflujo

Savina *et al.* (1986) afirman que esta reacción se podría justificar por el hecho de que cuando el HCl protona al doble enlace en C-12, se forma un carbocatión terciario muy estable en C-13, lugar donde se puede crear un nuevo doble enlace C-13/ C-18 gracias a la desprotonación del H-18. Incluso se podría originar un ataque nucleofílico intramolecular del ácido carboxílico (previa desprotonación del carboxilo) para formar una  $\gamma$ -lactona, como muestra la **figura 20**.

Curiosamente, Kubota *et al.* (1969) describieron una lactona análoga como subproducto de la isomerización del ácido quillaico en HCl.



**Figura 20:** Esquema de formación de derivados olean-13(18)-en-28-oicos (I) y lactónicos (II) mediante catálisis ácida de ácidos 18 $\alpha$ -olean-12-en-28-oicos. Tomado de Savina *et al.* (1986).

El ácido equinocístico, bajo estas mismas condiciones de hidrólisis, se transforma en su análogo olean-13(18)-eno, denominado ácido albigénico. Este resultado pone en duda lo afirmado por Barua y Raman (1959), quienes reportaron que este triterpenoide no es un producto de isomerización ácida del ácido equinocístico, sino que ambos están presentes en las semillas de *Albizzia lebbek* Benth.



Kubota *et al.* (1969) también afirman que la formación de olean-13(18)-enos se debe a la presencia de un 16 $\alpha$ -hidroxilo axial que se vuelve inestable en presencia de HCl en EtOH, aunque según lo demostrado por Barton *et al.* (1968), Brownlie *et al.* (1956), Davy *et al.* (1951) y Savina *et al.* (1986); el origen de estos derivados depende de la formación de un carbocatión terciario, gracias a la protonación del doble enlace y posterior desprotonación del H-18 en  $\alpha$ .

La formación de olean-13(18)-enos en la hidrólisis puede evitarse usando H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 1 N en 70% de etanol acuoso por 5 horas, aunque no se hidrolizarían la totalidad de las saponinas esperadas (Kubota *et al.*, 1969). Otros autores recomiendan el uso de HCl o H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> en MeOH anhidro para realizar dicha hidrólisis de saponinas (Zhang y Popovich, 2009; Ireland *et al.*, 1987).

Como puede verse en esta discusión, Qy6 es un derivado olean-13(18)-eno formado por la reacción de Qy1 (ácido quillaico) con el medio ácido. Se puede confirmar esta afirmación aislando ácido quillaico y sometiéndolo a las condiciones de hidrólisis descritas en esta memoria para determinar por CCF la disminución en la intensidad de Qy1 en desmedro de la aparición de la mancha característica para Qy6.

En vista de que Qy6 es un artefacto formado, y debido a que este producto pudo aislarse en mayor abundancia que otras saponinas distintas al ácido quillaico, se podrían manejar las condiciones de reacción para obtener este derivado con mayor rendimiento y especificidad (como aumentando las horas de hidrólisis, por ejemplo) y así poder evaluar posibles funcionalizaciones adicionales sobre Qy6. Bajo esta premisa, sería interesante evaluar que ocurriría con esqueletos triterpenoides análogos.

En el caso de Qy3, es difícil llegar a una afirmación categórica acerca del origen de su estructura (natural o artefacto), ya que a pesar de que se conocen bastantes grupos funcionales, ellos no permiten la caracterización completa de su esqueleto. Sólo se conoce que es un ácido triterpénico, presenta un aldehído y grupos metilos en su estructura. No presenta el doble enlace clásico en C-12/13 (ver **figura 16**), de modo que es necesario un estudio acabado de sus espectros.

En cuanto a la valoración HPLC del producto de hidrólisis obtenido a partir de saponinas de corteza de quillay (con HCl al 18% y 2 horas de calentamiento), Qy1 demostró ser la saponina principal por amplia mayoría (68,9%) con respecto al resto de las geninas. Por otro lado, Qy5 se encontró en un 5,0% dentro del producto de hidrólisis. Esto concuerda con el hecho de que el

ácido quillaico forma parte de la mayoría de las saponinas constituyentes de la corteza de quillay (Bankefors *et al.*, 2008; Guo y Kenne, 2000; Kite *et al.*, 2004).

Si bien es difícil encontrar la valoración de las sapogeninas de la corteza de quillay en la literatura, Kite *et al.* (2004) afirmaron que de las 67 saponinas de *Quillaja saponaria* cuyas estructuras se conocían a la fecha, 6 correspondieron a moléculas que contenían ácido 22 $\beta$ -hidroxi-quillaico como genina, 2 correspondieron a aquellas que contenían ácido fitolacagénico o su acetato como sapogenina, mientras que sólo 1 saponina presentó ácido equinocístico en su composición. El resto de las saponinas (la mayor parte), incluyendo las mayoritarias QS-17; QS-18 y QS-21, presentaron exclusivamente ácido quillaico como sapogenina.

Como conclusión general para la parte química, se puede afirmar que el cambio de condiciones para realizar la hidrólisis supone tener en consideración variables tales como: rendimiento neto del producto de hidrólisis, concentración de sapogenina a aislar dentro de éste, tiempo óptimo de hidrólisis, entre otros factores. Por ejemplo, si se quiere obtener ácido quillaico, se esperaría utilizar el mismo método utilizado en la presente memoria, ya que el rendimiento del producto de hidrólisis obtenido con HCl al 18% ha sido el mayor hasta el momento (39%), el tiempo de hidrólisis fue relativamente bajo (2 horas) y Qy1 se encuentra en una alta proporción dentro del producto de hidrólisis (69% según HPLC), por lo que no habría mayores problemas en su aislamiento. Distinto es el caso si se pretende aislar sapogeninas minoritarias, ya que es muy posible que en las condiciones descritas, una buena proporción de ellas se transforme en algún artefacto, disminuyendo aún más su abundancia relativa dentro del producto de hidrólisis y haciendo más complicada su obtención.

Surgen dudas acerca de si otras sapogeninas minoritarias disminuyeron su proporción en desmedro de la formación de artefactos (todas las geninas del quillay descritas en la literatura presentan la insaturación en C-12 y C-13) o si Qy3 y las otras geninas cuyas estructuras aún no se han dilucidado completamente correspondan a un compuesto nuevo o un producto formado en las condiciones de laboratorio en las que se trabajó.

## 7.2. GPa y su relación con las sapogeninas del quillay

A pesar de que las sapogeninas provenientes de la corteza del quillay derivan del ácido oleanólico (Nyberg *et al.*, 2003), todos los triterpenoides evaluados (incluyendo al producto de hidrólisis) como potenciales inhibidores de la GPa presentaron menor potencia que la molécula de referencia, en este caso la cafeína ( $IC_{50}$  compuestos evaluados  $\ggg$  278,8  $\mu$ M). Además, estos triterpenoides tuvieron una eficacia inferior a esta metilxantina ( $\%I$  máx<sub>cafeína</sub>: 68,4 %), a excepción de Qy3, como se discutirá más adelante.

En base a resultados obtenidos por Luo *et al.* (2008), el ácido quillaico 10  $\mu$ M no mostró actividad inhibitoria de la GPa, resultado similar al obtenido por el ácido equinocístico a la misma concentración, el cual presentó una baja capacidad inhibitoria (ver **tabla 14**). Se debe recordar que ambos compuestos están reportados en la corteza de quillay.

**Tabla 14:** Efecto inhibitorio sobre la GPa de diversos triterpenoides naturales (basado en el trabajo de Luo *et al.*, 2008)

Compuesto	Concentración ( $\mu$ M)	Inhibición $\pm$ S.E.M.(%)
Ácido oleanólico	10	73,07 $\pm$ 1,62
Ácido quillaico	10	Sin actividad
Ácido equinocístico	10	18,96 $\pm$ 0,35
Cafeína	5	40,53 $\pm$ 0,92
	10	50,00 $\pm$ 0,55
	50	94,42 $\pm$ 1,54

Además, en los derivados del oleanano es fundamental el ácido carboxílico, ya que a medida que se le añaden grupos lipofílicos, la potencia inhibitoria de la GPa va disminuyendo (Chen *et al.*, 2006; Chen *et al.*, 2008a; Chen *et al.*, 2008b).

Por otro lado, Luo *et al.* (2008) afirman en resultados preliminares que el grupo aldehído en C-23 genera moléculas con una menor potencia sobre la GPa, mientras que la sustitución por un

CH<sub>2</sub>OH en C-23 da origen a una actividad inhibitoria más potente. También afirman que el OH en C-3 es muy importante para la inhibición enzimática, y que la inclusión de un  $\alpha$ -hidroxilo en C-16 ejerce un efecto negativo en dicha actividad.

Al ver estos resultados y aplicarlos a Qy5 (ácido fitolacagénico), se podría suponer en forma preliminar que el éster metílico en C-20 generaría un efecto negativo en la potencia inhibitoria, ya que este triterpenoide cumple con todos los requisitos estructurales “beneficiosos” descritos anteriormente para una buena actividad inhibitoria de la GPa: OH en C-3; ácido carboxílico libre en C-28 y función CH<sub>2</sub>OH en C-23, sin embargo, su potencia y eficacia es menor a la cafeína.

El ácido quillaico y Qy6, que tienen un aldehído en C-23 y  $\alpha$ -hidroxilo en C-16, presentaron una baja actividad inhibitoria de la GPa a 100  $\mu$ M, concordando con lo afirmado por Luo *et al* (2008) acerca de la inactividad del ácido quillaico a 10  $\mu$ M sobre la inhibición de la GPa. Se puede inferir que el cambio de posición del doble enlace desde C-12/13 a C-13/18, como es el caso de Qy1 versus Qy6, disminuiría la potencia y eficacia, aunque no significativamente (**IC<sub>50</sub> Qy1**: 4411,0  $\mu$ M ; **%I máx Qy1**: 55,2% Vs **IC<sub>50</sub> Qy6**: 6072,0  $\mu$ M ; **%I máx Qy6**: 47,3%).

Acerca de Qy3, se puede decir que fue el triterpenoide más potente y eficaz (**IC<sub>50</sub> Qy3**: 1836,0  $\mu$ M ; **%I máx Qy3**: 81,5%) de los evaluados, incluso con una eficacia superior a la cafeína (**%I máx cafeína**: 68,4 %). Esto se debió a las características de su estructura que aún está en estudio.

En el caso del producto de hidrólisis, este presentó una escasa actividad inhibitoria de la GPa (**IC<sub>50</sub> producto de hidrólisis**: no se pudo determinar debido a su baja potencia; **%I máx producto de hidrólisis**: 16,8%). Esto podría explicarse debido a que Qy3, el triterpenoide más activo sobre la GPa, estaría en tan bajas concentraciones con respecto a otras moléculas inactivas, que su potencia inhibitoria se diluiría. Por otra parte, el producto de hidrólisis es una mezcla compleja de sapogeninas triterpénicas y otras sustancias que podrían ocupar los mismos lugares que Qy3 dentro de la GPa, por lo que se podría pensar una especie de antagonismo del resto de las sapogeninas del producto de hidrólisis.

Es importante considerar que estas son conjeturas preliminares, y por lo tanto, se necesitarían más estudios para determinar una relación estructura-actividad biológica acabada.

## VIII. CONCLUSIONES

Se consiguió optimizar el rendimiento de la hidrólisis de un extracto acuoso de corteza de quillay (Ultra Dry 100 Q) mediante HCl al 18%. El producto de hidrólisis obtenido tuvo un rendimiento del 39% con respecto al peso inicial del extracto acuoso de corteza de *Quillaja saponaria*.

Se lograron aislar 6 saponinas: dos de ellas correspondieron a ácido quillaico (Qy1) y ácido fitolacagénico (Qy5), ambas descritas como constituyentes de las saponinas de corteza de quillay; un artefacto isómero del ácido quillaico producido por catálisis ácida (Qy6); una saponina triterpénica parcialmente caracterizada que no presentó el doble enlace característico (Qy-3); y dos saponinas cuyas estructuras aún están en estudio (Qy2 y Qy4).

Se determinó que el ácido quillaico es la saponina principal del producto de hidrólisis (68,9%), y por ende, en las saponinas presentes en el Ultra Dry 100 Q. En tanto, el ácido fitolacagénico presentó una abundancia del 5,0% dentro del producto de hidrólisis.

Se logró montar la técnica de inhibición *in-vitro* de la GPa.

Se evaluaron 4 saponinas aisladas de la corteza de quillay además del producto de hidrólisis. Todas presentaron un bajo poder inhibitorio de la GPa (menor a la cafeína, molécula de referencia), excepto Qy3, que resultó tener más eficacia pero menos potencia que esta metilxantina. Estos resultados preliminares nos estarían indicando que la mayoría de las saponinas triterpénicas de quillay no inhiben a la GPa de forma importante.

Se deben realizar más estudios con respecto al aislamiento, identificación y valoración de los triterpenoides de *Quillaja saponaria*, sobre todo donde se puedan controlar las condiciones de hidrólisis ácida y así evitar la formación de artefactos.

Este estudio contribuyó a ampliar el conocimiento de la composición química de este árbol autóctono. Además se pudo evaluar su actividad inhibitoria de la GPa, demostrando que Qy3es el triterpenoide más eficaz.

## IX. BIBLIOGRAFÍA

Bankefors J, Nord LI, Kenne L. Structural classification of *Quillaja* saponins by electrospray ionization ion trap multiple-stage mass spectrometry in combination with multivariate analysis, proof of concept. *Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems*. **2008**, *90*, 178-87.

Barton DHR, Lier EF, McGhie JF. The synthesis of beta-amyrin. *J. Chem. Soc. C: Organic*. **1968**, 1031-40.

Barua AK, Raman SP. The constitution of albigenic acid – a new triterpenoid sapogenin from *Albizia lebbek* Benth. *Tetrahedron*. **1959**, *7*, 19-23.

British Pharmacopeia. London, Stationery Office, **2001**.

Brownlie G, Fayez MBE, Spring FS, Stevenson R, Strachan WS. Triterpenoids. Part XLVIII. Olean-13(18)-ene: Isomerisation of olean-12-ene and related hydrocarbons with mineral acid. *J. Chem. Soc.* **1956**, 1377-81.

Cañigueral S, Vila R, Wichtl M. Plantas medicinales y drogas vegetales para infusión y tisana. Un manual de bases científica para farmacéuticos y médicos. 1ª Ed. Milán, OEMF International, **2001**. 429-30.

Chapagain BP, Wiesman Z, Tsrer. *In vitro* study of the antifungal activity of saponin-rich extracts against prevalent phytopathogenic fungi. *Industrial Crops and Products*. **2007**, *26*, 109–15.

Chen J, Gong Y, Liu J, Hua W, Zhang L, Sun H. Synthesis and biological evaluation of novel pyrazolo[4,3-b]oleanane derivatives as inhibitors of glycogen phosphorylase. *Chem Biodivers*. **2008a**, *5*, 1304-12.

Chen J, Gong YC, Liu J, Zhang LY, Hua WY, Sun HB. Synthesis and biological evaluation of substituted phenylpyrazole[4,5-b]oleanane derivatives as inhibitors of glycogen phosphorylase. *Drug Discov Ther.* **2008b**, 2, 115-121.

Chen J, Liu J, Zhang L, Wu G, Hua W, Wu X, Sun H. Pentacyclic triterpenes. Part 3: Synthesis and biological evaluation of oleanolic acid derivatives as novel inhibitors of glycogen phosphorylase. *Bioorg Med Chem Lett.* **2006**, 16, 2915-9.

Dalsgaard K. Saponin adjuvants. 3. Isolation of a substance from *Quillaja saponaria* Molina with adjuvant activity in food-and-mouth disease vaccines. *Arch Gesamte Virusforsch.* **1974**, 44, 243-54.

Davy GS, Halsall TG, Jones ERH. The chemistry of the triterpenes. Part VIII. The  $\alpha$ - and  $\beta$ -amyrenes. *J. Chem. Soc.* **1951**, 458-61.

Güçlü-Ustündağ O, Mazza G. Saponins: properties, applications and processing. *Crit Rev Food Sci Nutr.* **2007**, 47, 231-58.

Guo S, Kenne L. Structural studies of triterpenoid saponins with new acyl components from *Quillaja saponaria* Molina. *Phytochemistry.* **2000**, 55, 419-28.

Hristov AN, Zaman S, VanderPol M, Szasz P, Huber K, Greer D. Effect of a saponin-based surfactant and aging time on ruminal degradability of flaked corn grain dry matter and starch. *J Anim Sci.* **2007**, 85, 1459-66.

Ireland PA, Dziedzic SZ, Drew M, Forsyth GA. Structure of soyasapogenol B1. *J. Agric. Food Chem.* **1987**, 35, 971-3.

James JT, Dubery IA. Pentacyclic triterpenoids from the medicinal herb, *Centella asiatica* (L.) Urban. *Molecules.* **2009**, 14, 3922-41.

Karis ND, Loughlin WA, Jenkins ID, Healy PC. Glycogen phosphorylase inhibitory effects of 2-oxo-1,2-dihydropyridin-3-yl amide derivatives. *Bioorg Med Chem.* **2009**, *17*, 4724-33.

Kensil CR, Patel U, Lennick M, Marciani D. Separation and characterization of saponins with adjuvant activity from *Quillaja saponaria* Molina cortex. *J Immunol.* **1991**, *146*, 431-7.

Kim SW, Park SK, Kang SI, Kang HC, Oh HJ, Bae CY, Bae DH. Hypocholesterolemic property of *Yucca schidigera* and *Quillaja saponaria* extracts in human body. *Arch Pharm Res.* **2003**, *26*, 1042-6.

Kim YJ, Wang P, Navarro-Villalobos M, Rohde BD, Derryberry J, Gin DY. Synthetic studies of complex immunostimulants from *Quillaja saponaria*: synthesis of the potent clinical immunoadjuvant QS-21Aapi. *J Am Chem Soc.* **2006**, *128*, 11906-15.

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.* **2004**, *18*, 2859-70.

Kristiansen M, Andersen B, Iversen LF, Westergaard N. Identification, synthesis, and characterization of new glycogen phosphorylase inhibitors binding to the allosteric AMP site. *J Med Chem.* **2004**, *47*, 3537-45.

Kubota T, Kitatani H, Hinoh H. Isomerisation of quillaic acid and echinocystic acid with hydrochloric acid. *Tetrahedron Lett.* **1969**, *10*, 771-774.

Luo JG, Liu J, Kong LY. New pentacyclic triterpenes from *Gypsophila oldhamiana* and their biological evaluation as glycogen phosphorylase inhibitors. *Chem Biodivers.* **2008**, *5*, 751-7.



Martin WH, Hoover DJ, Armento SJ, Stock IA, McPherson RK, Danley DE, Stevenson RW, Barrett EJ, Treadway JL. Discovery of a human liver glycogen phosphorylase inhibitor that lowers blood glucose in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **1998**, *95*, 1776-81.

Matsuda H, Morikawa T, Ueda H, Yoshikawa M. Medicinal foodstuffs. XXVII. Saponin constituents of gotu kola (2): structures of new ursane- and oleanane-type triterpene oligoglycosides, centellasaponins B, C, and D, from *Centella asiatica* cultivated in Sri Lanka. *Chem Pharm Bull (Tokyo)*. **2001**, *49*, 1368-71.

Meesapyodsuk D, Balsevich J, Reed DW, Covello PS. Saponin Biosynthesis in *Saponaria vaccaria*. cDNAs Encoding  $\beta$ -Amyrin Synthase and a Triterpene Carboxylic Acid Glucosyltransferase. *Plant Physiol*. **2007**, *143*, 959-969.

Mitra S, Dungan SR. Cholesterol solubilization in aqueous micellar solutions of *Quillaja* saponin, bile salts, or nonionic surfactants. *J Agric Food Chem*. **2001**, *49*, 384-94.

Morganti P, Fionda A, Elia U, Tiberi L. Extraction and analysis of cosmetic active ingredients from an anti-cellulitis transdermal delivery system by high-performance liquid chromatography. *J. Chromatogr. Sci*. **1999**, *37*, 51-5.

Niranjan Reddy VL, Ravikanth V, Vijender Reddy A, Prabhakar Rao T, Venkateswarlu Y. An unusual novel triterpenoid ether, multiflor-7-en-12,13-ether from *Wattakaka volubilis*. *Tetrahedron Letters*. **2002**. *43*, 1307-11.

Nyberg NT, Baumann H, Kenne L. Solid-phase extraction NMR studies of chromatographic fractions of saponins from *Quillaja saponaria*. *Anal Chem*. **2003**, *75*, 268-74.

Nyberg NT, Kenne L, Rönnberg B, Sundquist B. Separation and structural analysis of some saponins from *Quillaja saponaria*. *Carbohydr. Res*. **2000**, *323*, 87-97.

Oda K, Matsuda H, Murakami T, Katayama S, Ohgitani T, Yoshikawa M. Adjuvant and haemolytic activities of 47 saponins derived from medicinal and food plants. *Biol. Chem.* **2000**, *381*, 67–74.

Oikonomakos NG, Somsák L. Advances in glycogen phosphorylase inhibitor design. *Curr Opin Investig Drugs.* **2008**, *9*, 379-95.

Palatnik de Sousa CB, Santos WR, Casas CP, Paraguai de Souza E, Tinoco LW, da Silva BP, Palatnik M, Parente JP. Protective vaccination against murine visceral leishmaniasis using aldehyde-containing *Quillaja saponaria* saponinins. *Vaccine.* **2004**, *22*, 2470-9.

PDR for Herbal Medicines, first ed. Montvale, NJ, Medical Economics Company, **1998**. 1079-80.

Pham HL, Ross BP, McGeary RP, Shaw PN, Hewavitharana AK, Davies NM. Saponins from *Quillaja saponaria* Molina: isolation, characterization and ability to form immunostimulatory complexes (ISCOMs). *Curr Drug Deliv.* **2006**, *3*, 389-97.

Price KR, Johnson IT, Fenwick GR. The chemistry and biological significance of saponins in foods and feedstuffs. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* **1987**, *26*, 27–135.

Razdan TK, Harkar S, Kachroo V, Koul GL. Phytolaccanol and epiacetylaleuritolic acid, two triterpenoids from *Phytolacca acinosa*. *Phytochemistry.* **1982**, *21*, 2339-42.

Roner MR, Sprayberry J, Spinks M, Dhanji S. Antiviral activity obtained from aqueous extracts of the Chilean soapbark tree (*Quillaja saponaria* Molina). *J Gen Virol.* **2007**, *88*, 275-85.

San Martín R, Briones R, Quality control of commercial quillaja (*Quillaja saponaria* Molina) extracts by reverse phase HPLC. *Journal of the Science of Food and Agriculture*. **2000**, 80, 2063–68.

San Martín R, Magunacelaya JC, Control of plant-parasitic nematodes with extracts of *Quillaja saponaria*. *Nematology*. **2005**, 7, 577-85.

San Martín RM, Otero AF, Figueroa M, Escobar V, Cruz A. Use of quillaja saponins (*Quillaja saponaria* Molina) to control acid mist in copper electrowinning processes: Part 2: pilot plant and industrial scale evaluation. *Hydrometallurgy*. **2005**, 77, 171-81.

Savina AA, Fesenko DA, Sheichenko VI, Shavlinskii AN. Nature of the transformations of oleanolic acid in an acid medium. *Chemistry of Natural Compounds*. **1986**, 22, 295-297.

Schaneberg BT, Mikell JR, Bedir E, Khan IA. An improved HPLC method for quantitative determination of six triterpenes in *Centella asiatica* extracts and commercial products. *Pharmazie*. **2003**, 58, 381-4.

Soeder CJ, Papaderos A, Kleespies M, Kneifel H, Haegel FH, Webb L. Influence of phytogenic surfactants (quillaja saponin and soya lecithin) on bio-elimination of phenanthrene and fluoranthene by three bacteria. *Appl Microbiol Biotechnol*. **1996**, 44, 654-9.

Somsák L, Czifrák K, Tóth M, Bokor E, Chrysina ED, Alexacou KM, Hayes JM, Tiraidis C, Lazoura E, Leonidas DD, Zographos SE, Oikonomakos NG. New inhibitors of glycogen phosphorylase as potential antidiabetic agents. *Curr Med Chem*. **2008**, 15, 2933-83.

Sparg SG, Light ME, Van Staden J. Biological activities and distribution of plant saponins. *J. Ethnopharmacol*. **2004**, 94, 219–43.

Still WC, Kahn M, Mitra A. Rapid chromatographic technique for preparative separations with moderate resolution. *The Journal of Organic Chemistr.* **1978**, *43*, 2923-5.

Uematsu Y, Hirata K, Saito K. Spectrophotometric determination of saponin in *Yucca* extract used as food additive. *J. AOAC Int.* **2000**, *83*, 1451-4.

Ulubelen A, Brieskorn CH, Özdemir N. Triterpenoids of *Salvia horminum*, constitution of a new diol. *Phytochemistry.* **1977**, *16*, 790-791.

Van Setten DC, Ten Hove GJ, Wiertz EJ, Kamerling JP, Van de Werken G. Multiple-stage tandem mass spectrometry for structural characterization of saponins. *Anal Chem.* **1998**, *70*, 4401-9.

Vincken JP, Heng L, de Groot A, Gruppen H. Saponins, classification and occurrence in the plant kingdom. *Phytochemistry.* **2007**, *68*, 275-97.

Wen X, Sun H, Liu J, Cheng K, Zhang P, Zhang L, Hao J, Zhang L, Ni P, Zographos SE, Leonidas DD, Alexacou KM, Gimisis T, Hayes JM, Oikonomakos NG. Naturally occurring pentacyclic triterpenes as inhibitors of glycogen phosphorylase: synthesis, structure-activity relationships, and X-ray crystallographic studies. *J Med Chem.* **2008**, *51*, 3540-54.

Xie WD, Li PL, Jia ZJ. Petatrichol B: A Pentacyclic Triterpenoid with Unusual Skeleton from *Petasites tricholobus*. *Chinese Chemical Letters.* **2005**, *16*, 1351-3.

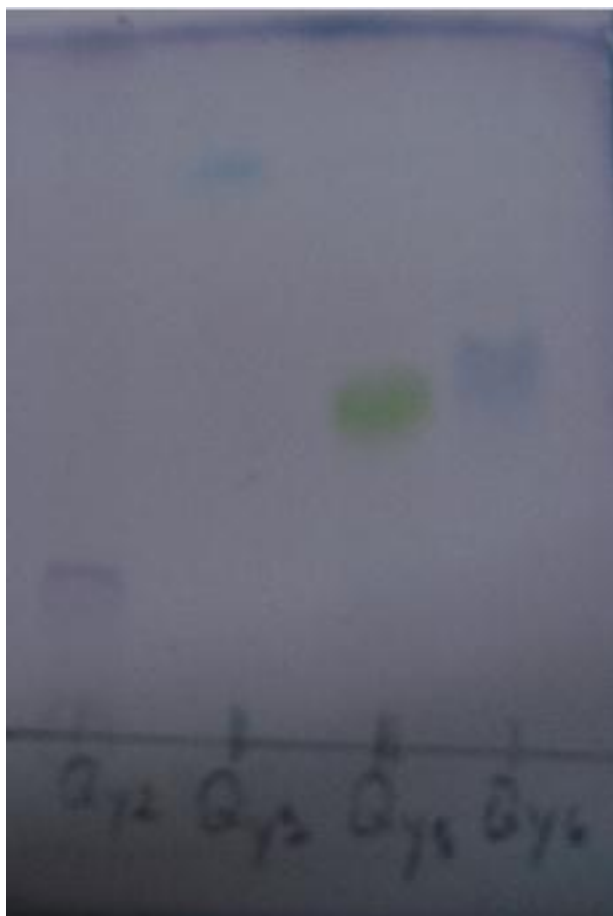
Yun KJ, Kim JY, Kim JB, Lee KW, Jeong SY, Park HJ, Jung HJ, Cho YW, Yun K, Lee KT. Inhibition of LPS-induced NO and PGE2 production by asiatic acid via NF-kappa B inactivation in RAW 264.7 macrophages: possible involvement of the IKK and MAPK pathways. *Int Immunopharmacol.* **2008**, *74*, 2593-604.

Zhang W, Popovich DG. Chemical and biological characterization of oleanane triterpenoids from soy. *Molecules*. **2009**, *14*, 2959-75.

## ANEXOS



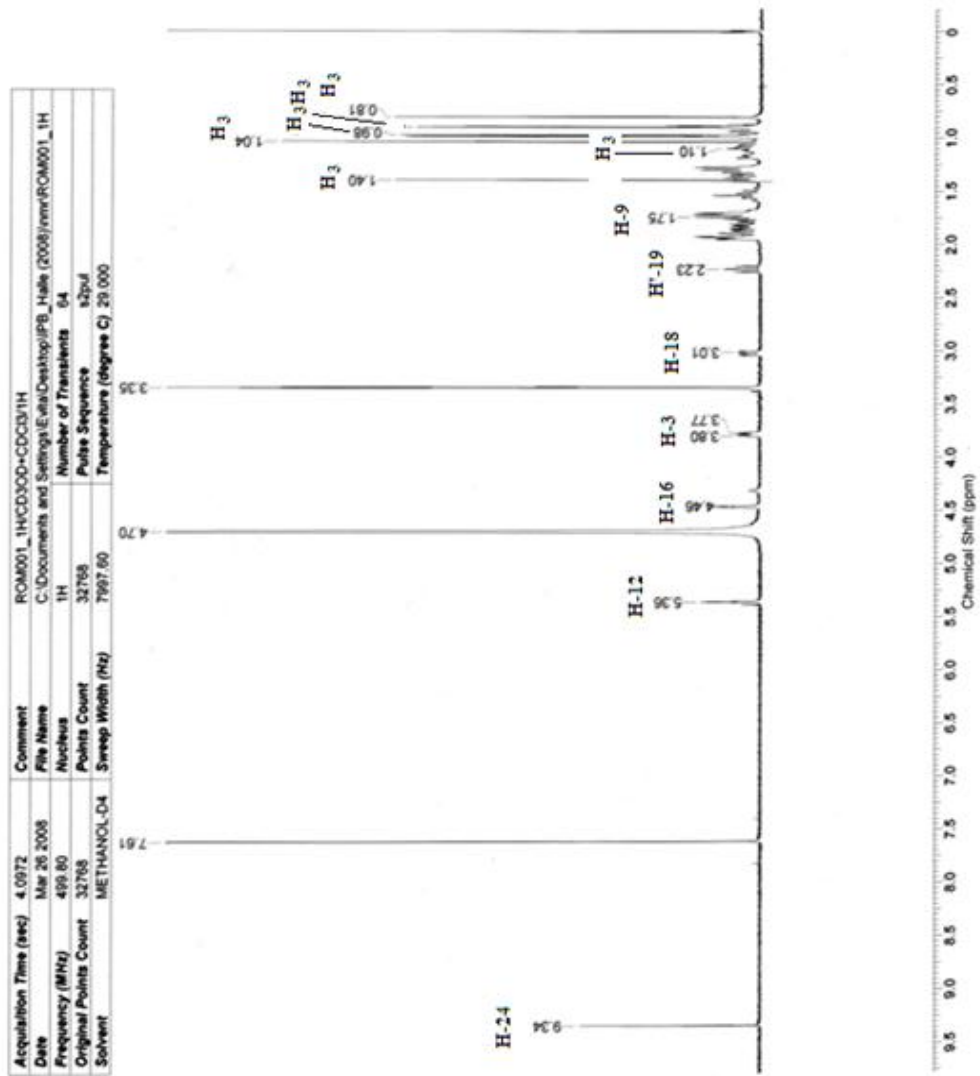
**Anexo A:** Fotografía del árbol de quillay (a la izquierda), de las flores en forma de estrella (arriba a la derecha) y del fruto abierto con parte de la lámina foliar de fondo (abajo a la derecha)



**Anexo B:** CCF de algunas de las sapogeninas aisladas de la corteza de quillay. De izquierda a derecha aparecen respectivamente Qy2, Qy3, Qy5 y Qy6

Anexo C: Espectros de RMN de Qy1 aislado de un extracto acuoso de corteza de quillay

Anexo C1: Espectro de  $^1\text{H}$

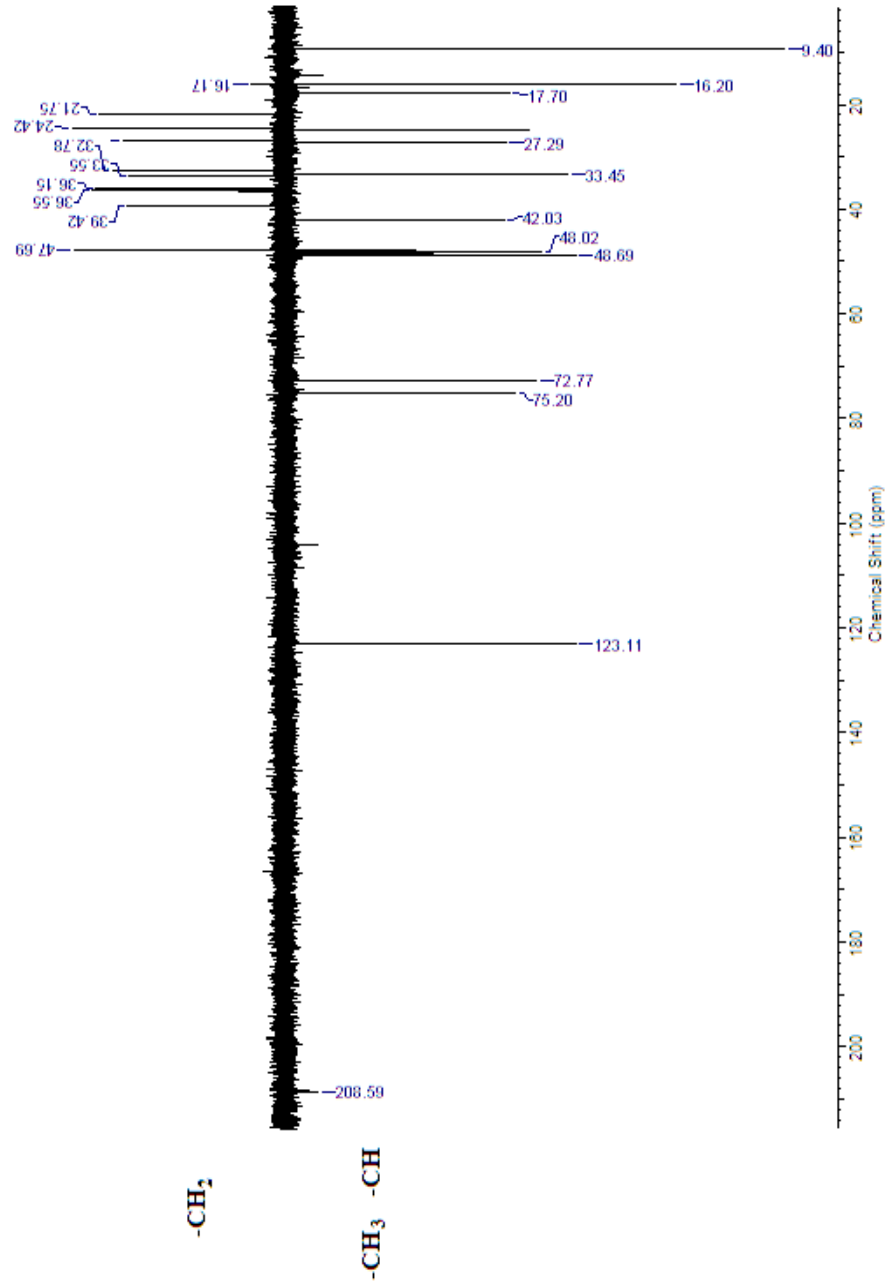




## Anexo C2: Espectro de $^{13}\text{C}$

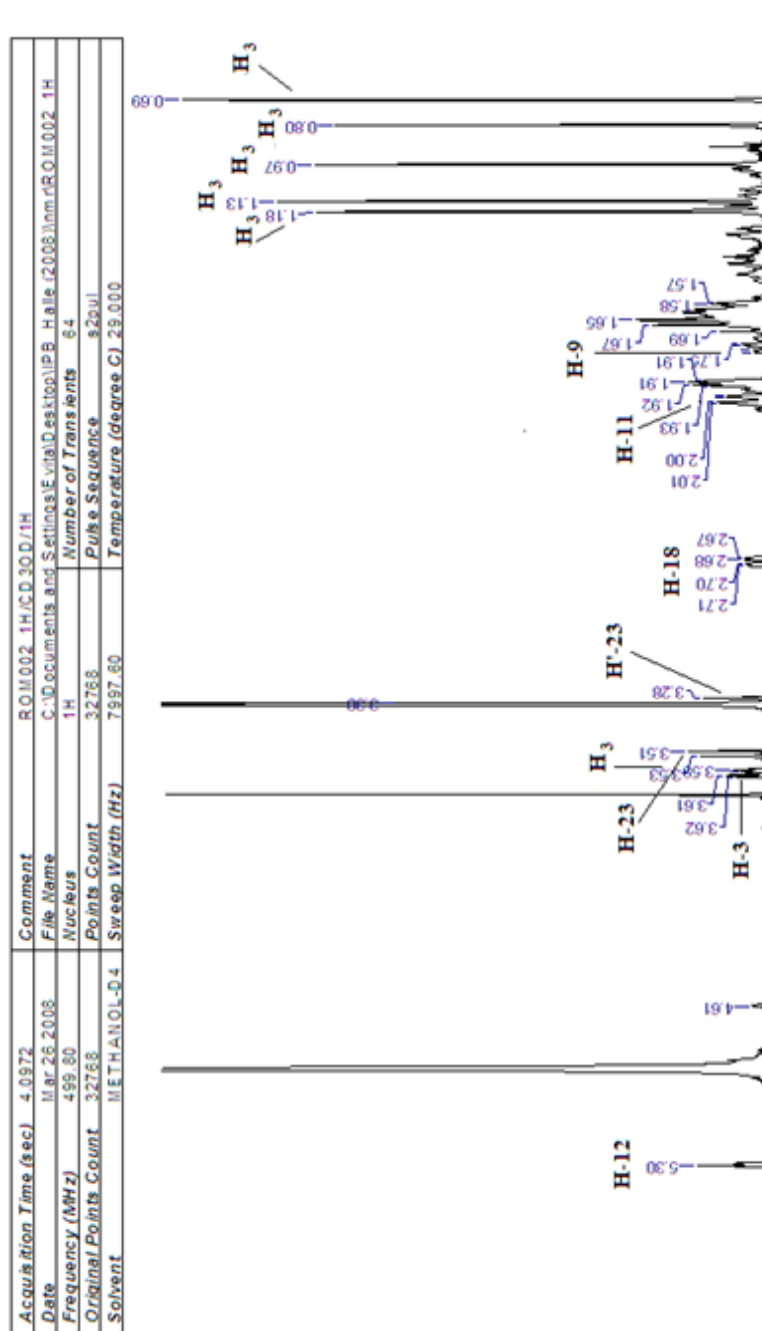


### Anexo C3: Espectro DEPT 135

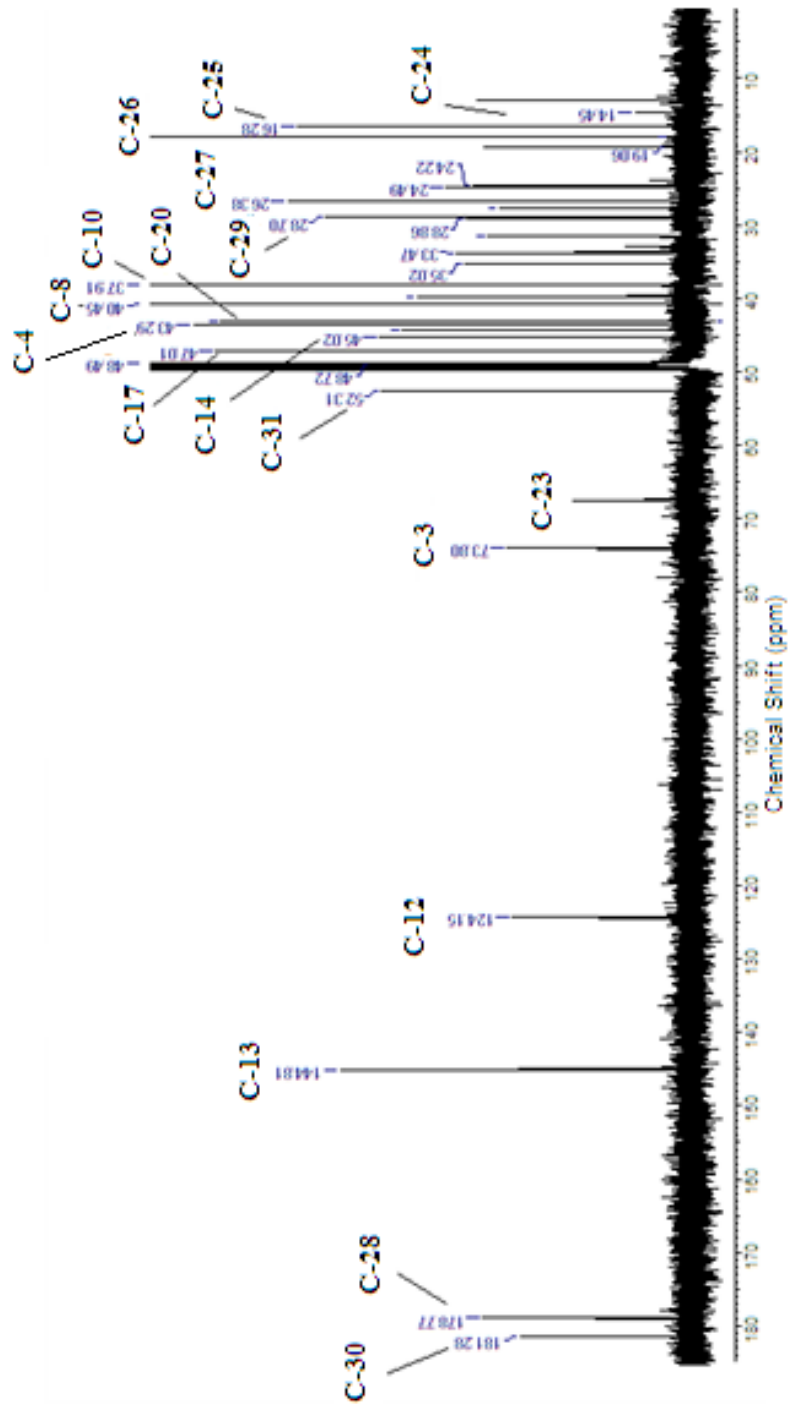


Anexo D: Espectros de RMN de Qy5 aislado de un extracto acuoso de corteza de quillay

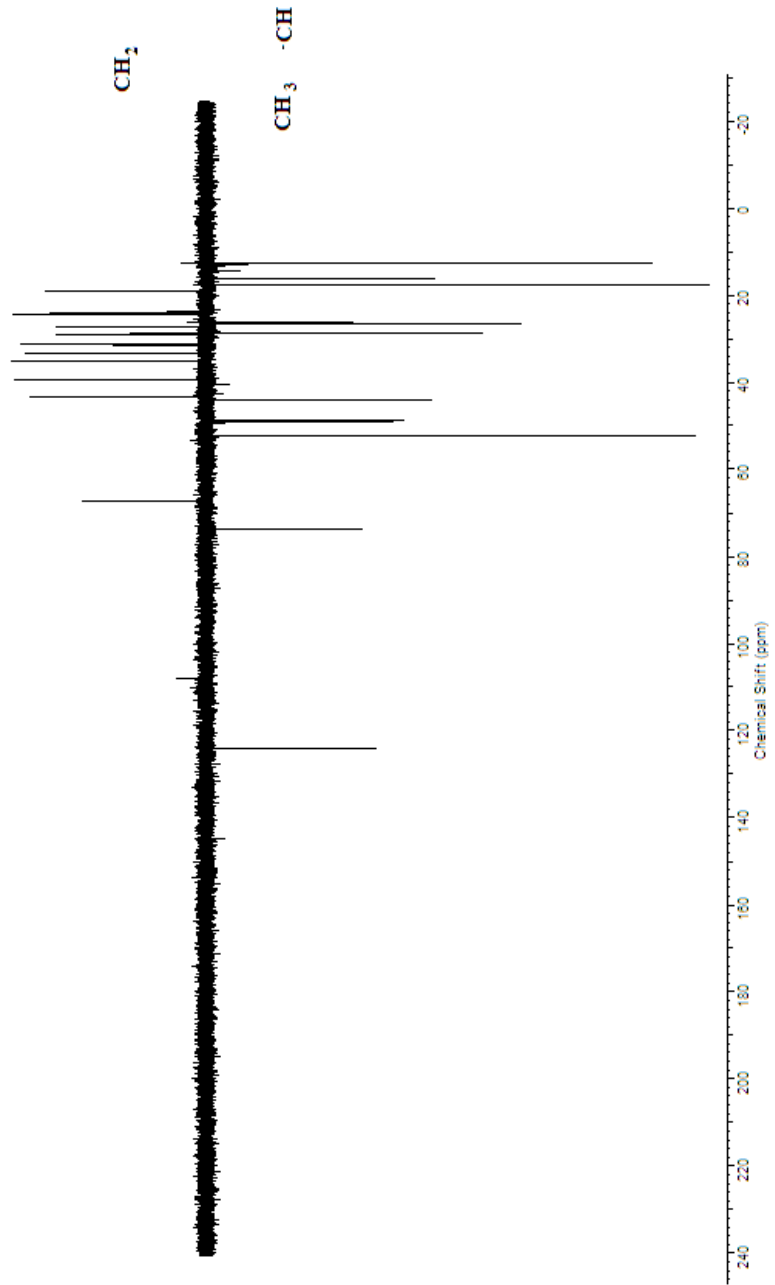
Anexo D1: Espectro de  $^1\text{H}$



Anexo D2: Espectro de  $^{13}\text{C}$

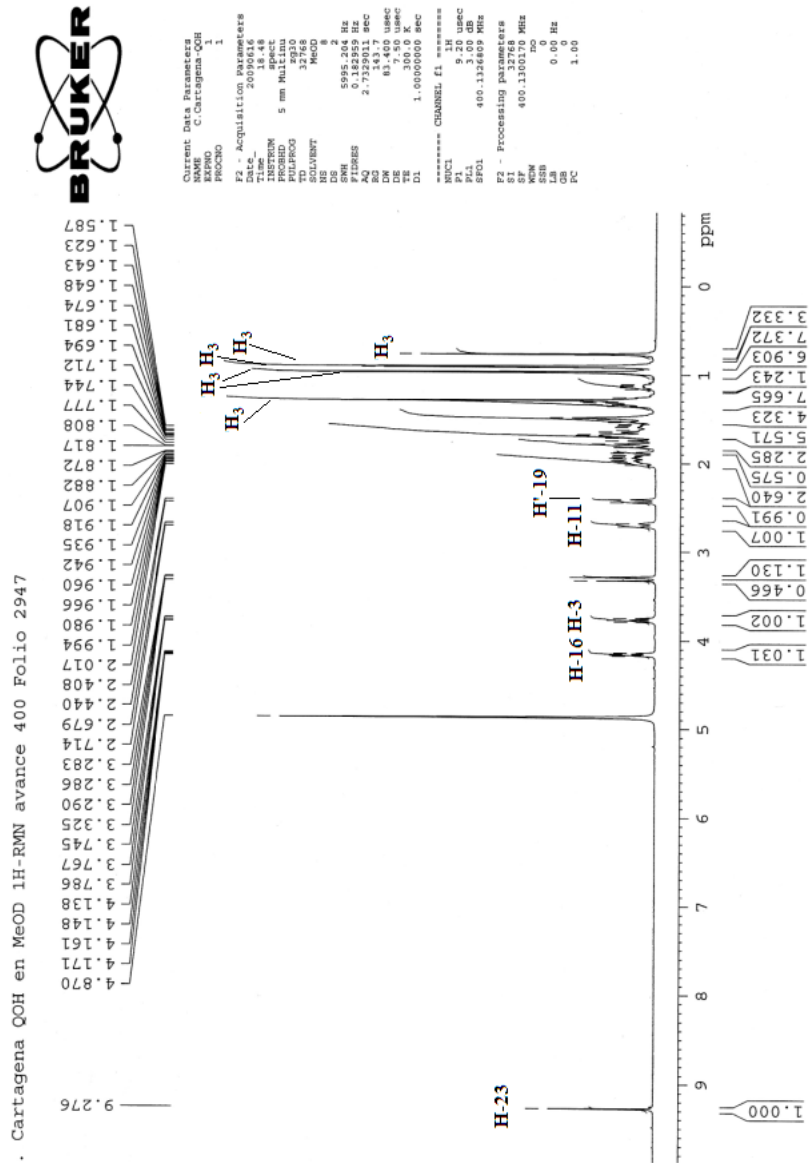


Anexo D3: Espectro DEPT 135



Anexo E: Espectros de RMN de Qy6 aislado de un extracto acuoso de corteza de quillay

Anexo E1: Espectro de <sup>1</sup>H

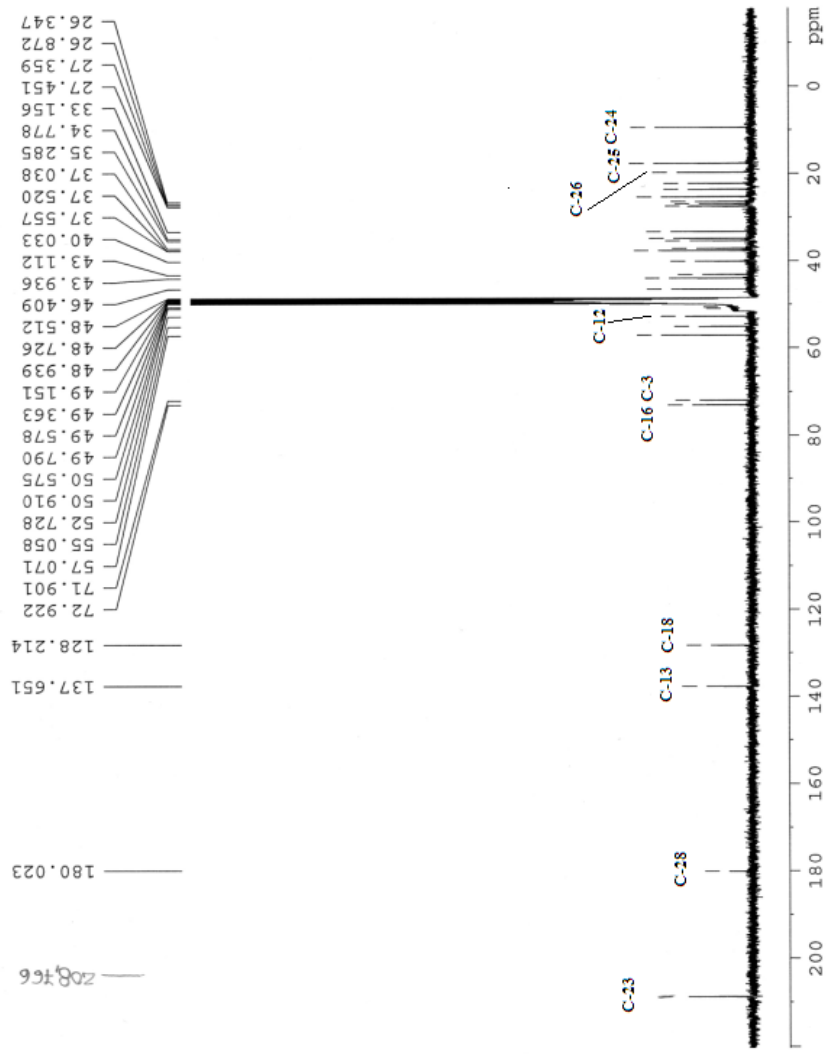


# Anexo E2: Espectro de <sup>13</sup>C



```

Current Data Parameters
NAME      C:Cartagena-QR
PROCNO    1
-----
F2 - Acquisition Parameters
Date_     20090618
Time      11:00:00
INSTRUM   spect
PROBHD    5 mm MUX100
PULPROG   zgpg30
TD        65536
SFO       125.760 MHz
AQ        0.50000000 sec
RG        327.68
WDW        EM
SSB        0
GB         0
PC         1.00
===== CHANNEL F1 =====
NUC1       13
P1         13.50 usec
PL1        0.00 dB
SFO1       125.760 MHz
===== CHANNEL F2 =====
CROSSP222
PULPROG222  zgpg30
NUC2         13
P2          13.50 usec
PL2         0.00 dB
SFO2        125.760 MHz
===== CHANNEL F3 =====
CROSSP333
PULPROG333  zgpg30
NUC3         13
P3          13.50 usec
PL3         0.00 dB
SFO3        125.760 MHz
-----
F2 - Processing parameters
SF         100.626210 MHz
WDW        EM
SSB        0
GB         0
PC         1.00
  
```



# Anexo E3: Espectro DEPT 135



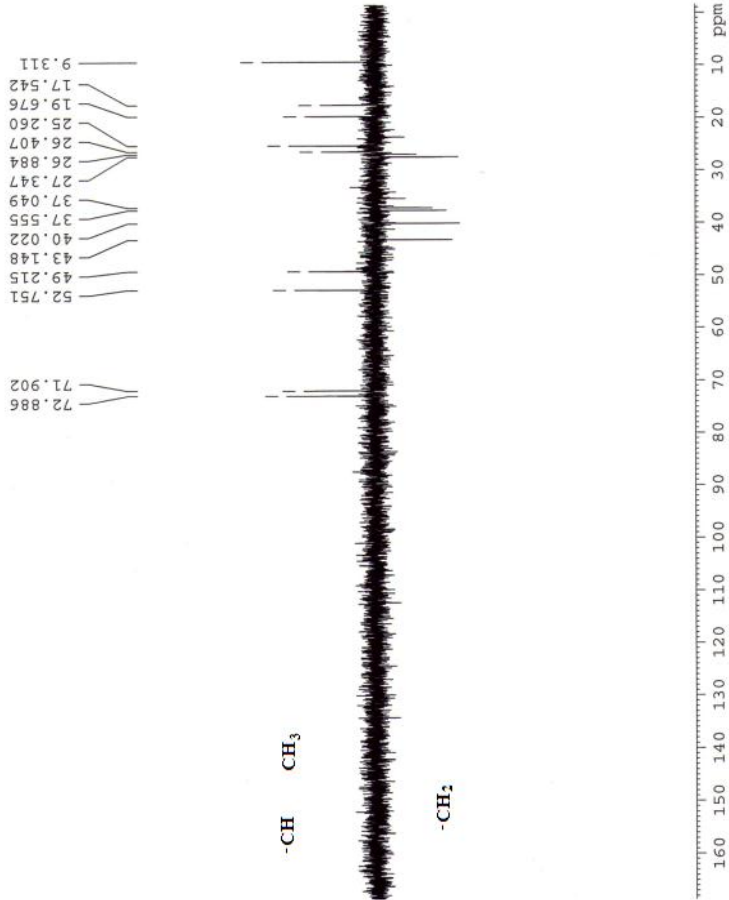
Current Data Parameters  
 Name: 100613001  
 ExpNO: C.Cartagena-Ort  
 PROCNO: 1

F2 - Acquisition Parameters  
 Date\_ Time: 20090618 4.31  
 INSTRUM: spect  
 PROBDI: 5 mm Maltin  
 PULPROG: zgpg30  
 TD: 65536  
 SOLVENT: CDCl3  
 NS: 1024  
 DS: 4  
 SWH: 17123.287 Hz  
 FIDRES: 0.261281 Hz  
 AQ: 1.9137012 sec  
 RG: 327.5  
 DW: 29.200 usec  
 DE: 7.50 usec  
 TE: 300.2 K  
 D1: 2.00000000 sec  
 d12: 0.00344828 sec  
 d13: 0.00000000 sec  
 DELTA: 0.00002195 sec

===== CHANNEL f1 =====  
 NUC1: 13C  
 P1: 12.00 usec  
 PL1: 0.00 dB  
 SFO1: 100.6210152 MHz

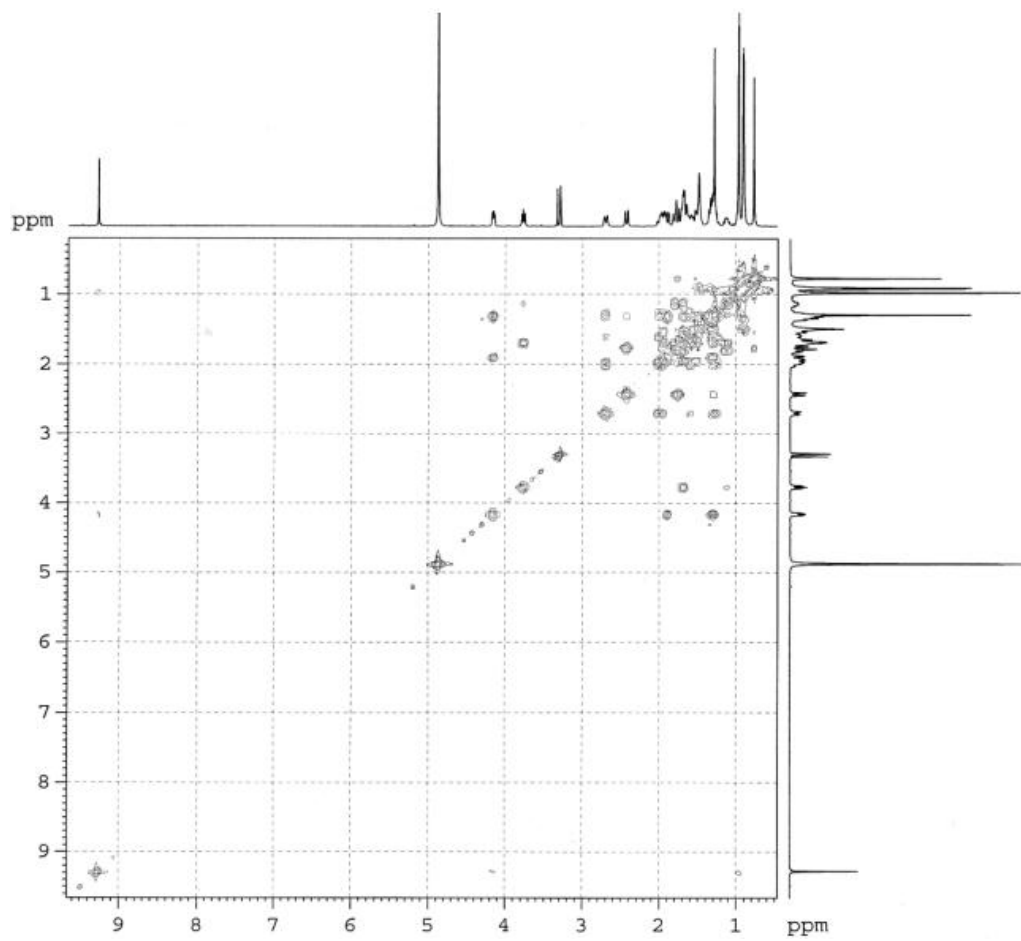
===== CHANNEL f2 =====  
 CPDPRG2: waltz16  
 NUC2: 1H  
 P2: 9.00 usec  
 PL2: 19.40 dB  
 SFO2: 400.1146095 MHz

F2 - Processing parameters  
 SI: 32768  
 SF: 100.6126115 MHz  
 MDW: 0  
 SSB: 0  
 GB: 0  
 PC: 1.00

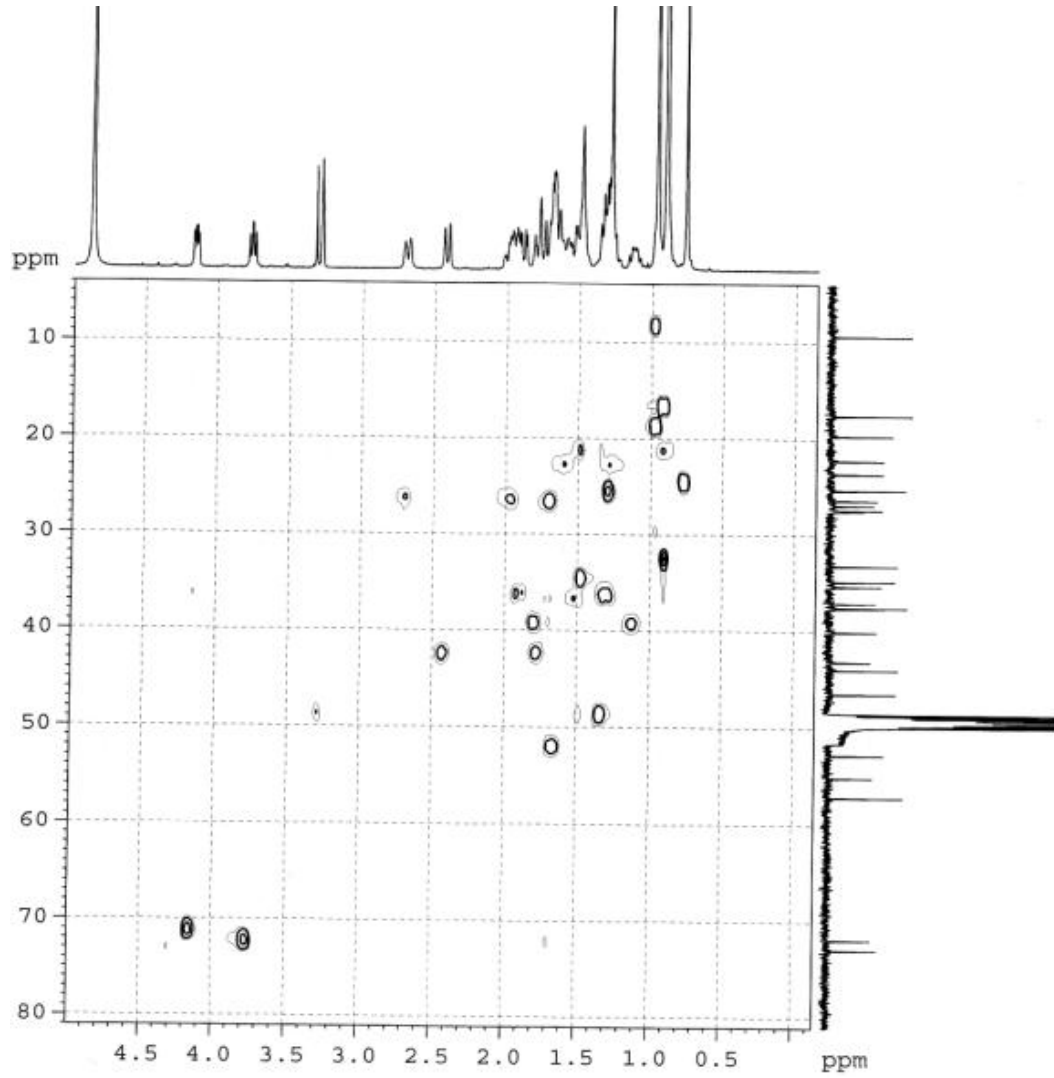




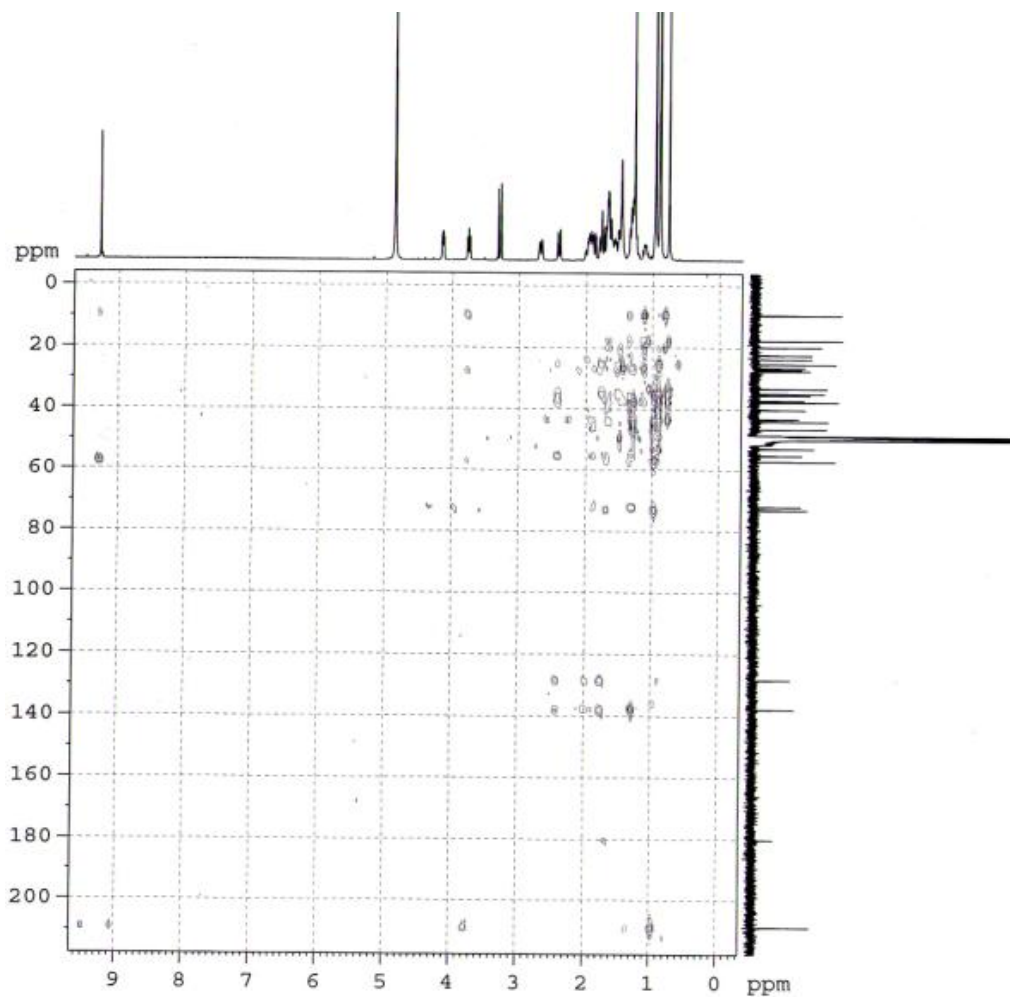
Anexo E4: Espectro COSY



Anexo E5: Espectro HSQC



Anexo E6: Espectro HMBC

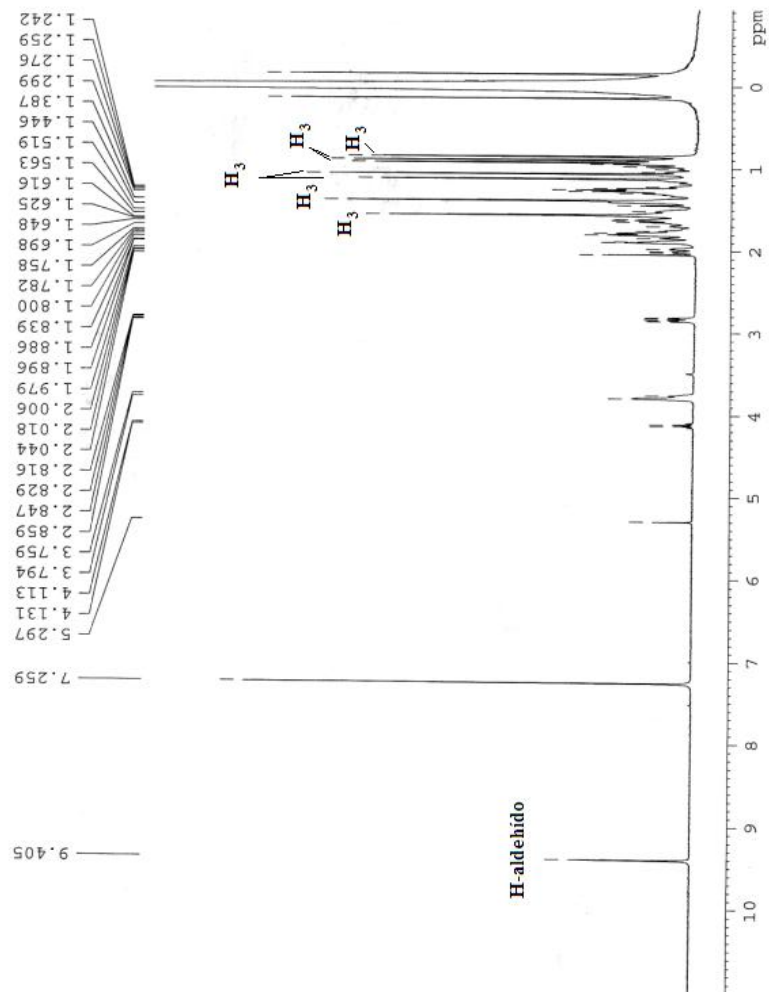


Anexo F: Espectros de RMN de Qy3 aislado de un extracto acuoso de corteza de quillay

Anexo F1: Espectro de  $^1\text{H}$



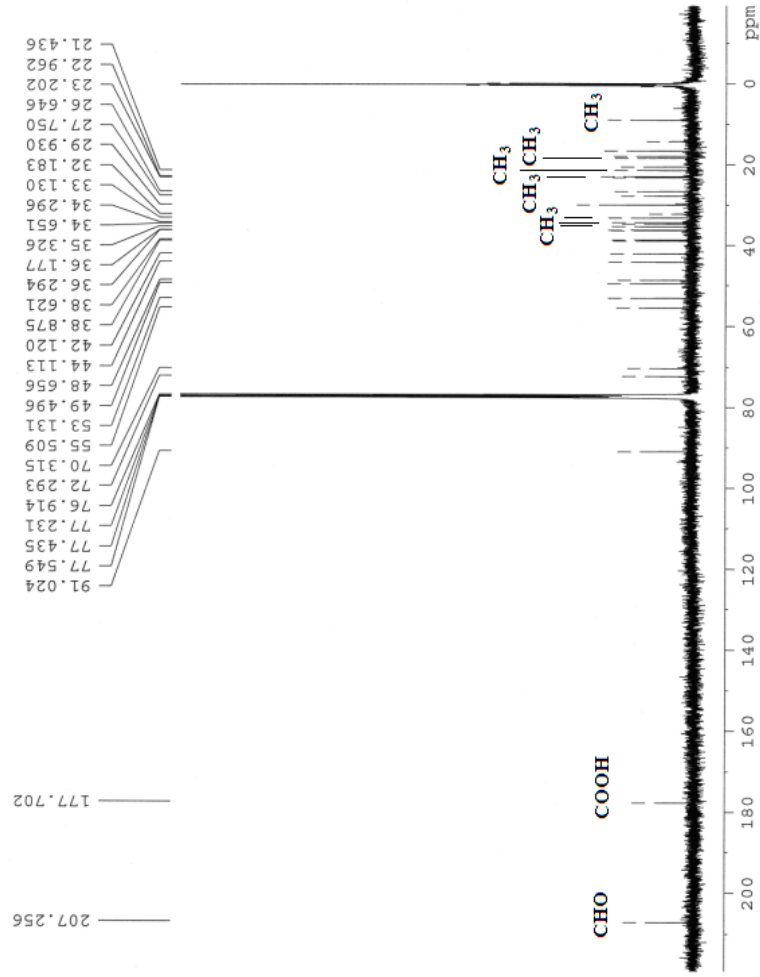
Current Data Parameters  
 NAME: C:Carlagama-QA001  
 PROCNO: 1  
 F2 - Acquisition Parameters  
 Date\_ Time: 20060505 16:46  
 INSTRUM: spect  
 PROBHD: 5 mm MSL100  
 PULPROG: zgpg30  
 TD: 32768  
 SOLVENT: CDCl3  
 NS: 2  
 DS: 2  
 SWH: 9982.508 Hz  
 FIDRES: 0.001166 Hz  
 AQ: 2.7329011 sec  
 RM: 35.8  
 SI: 32.0  
 SF: 7.55 usec  
 DE: 300.0 K  
 TE: 1.0000000 sec  
 ===== CHANNEL f1 =====  
 NUC1:  $^1\text{H}$   
 P1: 9.20 usec  
 PL1: 3.00 dB  
 SFO1: 400.136000 MHz  
 F2 - Processing parameters  
 SI: 32.0  
 SF: 400.1360166 MHz  
 DS: 2  
 SSB: 0.00 Hz  
 GB: 0  
 PC: 1.00



# Anexo F2: Espectro de <sup>13</sup>C



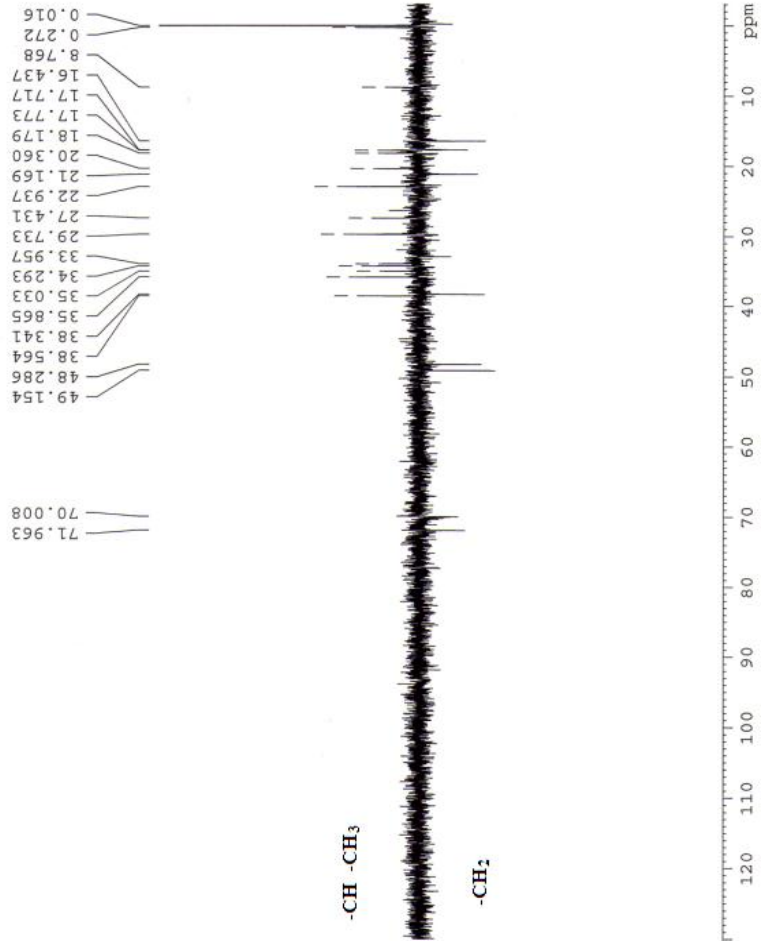
Current Data Parameters  
 NAME: C-DATAPARMA-Q0401  
 PREPROG: 1  
 F2 - Acquisition Parameters  
 Date\_ Time: 20080804 4:22  
 PROBHD: 5 mm NUC130  
 PULPROG: zgpg30  
 SOLVENT: CDCl3  
 D1: 1.00000000 s  
 D2: 0.05000000 s  
 D3: 0.05000000 s  
 D4: 0.05000000 s  
 D5: 0.05000000 s  
 D6: 0.05000000 s  
 D7: 0.05000000 s  
 D8: 0.05000000 s  
 D9: 0.05000000 s  
 D10: 0.05000000 s  
 D11: 0.05000000 s  
 D12: 0.05000000 s  
 CHANB1: F1 13C  
 CHANB2: F2 13C  
 CHANB3: F3 13C  
 CHANB4: F4 13C  
 CHANB5: F5 13C  
 CHANB6: F6 13C  
 CHANB7: F7 13C  
 CHANB8: F8 13C  
 CHANB9: F9 13C  
 CHANB10: F10 13C  
 CHANB11: F11 13C  
 CHANB12: F12 13C  
 CHANB13: F13 13C  
 CHANB14: F14 13C  
 CHANB15: F15 13C  
 CHANB16: F16 13C  
 CHANB17: F17 13C  
 CHANB18: F18 13C  
 CHANB19: F19 13C  
 CHANB20: F20 13C  
 CHANB21: F21 13C  
 CHANB22: F22 13C  
 CHANB23: F23 13C  
 CHANB24: F24 13C  
 CHANB25: F25 13C  
 CHANB26: F26 13C  
 CHANB27: F27 13C  
 CHANB28: F28 13C  
 CHANB29: F29 13C  
 CHANB30: F30 13C  
 CHANB31: F31 13C  
 CHANB32: F32 13C  
 CHANB33: F33 13C  
 CHANB34: F34 13C  
 CHANB35: F35 13C  
 CHANB36: F36 13C  
 CHANB37: F37 13C  
 CHANB38: F38 13C  
 CHANB39: F39 13C  
 CHANB40: F40 13C  
 CHANB41: F41 13C  
 CHANB42: F42 13C  
 CHANB43: F43 13C  
 CHANB44: F44 13C  
 CHANB45: F45 13C  
 CHANB46: F46 13C  
 CHANB47: F47 13C  
 CHANB48: F48 13C  
 CHANB49: F49 13C  
 CHANB50: F50 13C  
 CHANB51: F51 13C  
 CHANB52: F52 13C  
 CHANB53: F53 13C  
 CHANB54: F54 13C  
 CHANB55: F55 13C  
 CHANB56: F56 13C  
 CHANB57: F57 13C  
 CHANB58: F58 13C  
 CHANB59: F59 13C  
 CHANB60: F60 13C  
 CHANB61: F61 13C  
 CHANB62: F62 13C  
 CHANB63: F63 13C  
 CHANB64: F64 13C  
 CHANB65: F65 13C  
 CHANB66: F66 13C  
 CHANB67: F67 13C  
 CHANB68: F68 13C  
 CHANB69: F69 13C  
 CHANB70: F70 13C  
 CHANB71: F71 13C  
 CHANB72: F72 13C  
 CHANB73: F73 13C  
 CHANB74: F74 13C  
 CHANB75: F75 13C  
 CHANB76: F76 13C  
 CHANB77: F77 13C  
 CHANB78: F78 13C  
 CHANB79: F79 13C  
 CHANB80: F80 13C  
 CHANB81: F81 13C  
 CHANB82: F82 13C  
 CHANB83: F83 13C  
 CHANB84: F84 13C  
 CHANB85: F85 13C  
 CHANB86: F86 13C  
 CHANB87: F87 13C  
 CHANB88: F88 13C  
 CHANB89: F89 13C  
 CHANB90: F90 13C  
 CHANB91: F91 13C  
 CHANB92: F92 13C  
 CHANB93: F93 13C  
 CHANB94: F94 13C  
 CHANB95: F95 13C  
 CHANB96: F96 13C  
 CHANB97: F97 13C  
 CHANB98: F98 13C  
 CHANB99: F99 13C  
 CHANB100: F100 13C



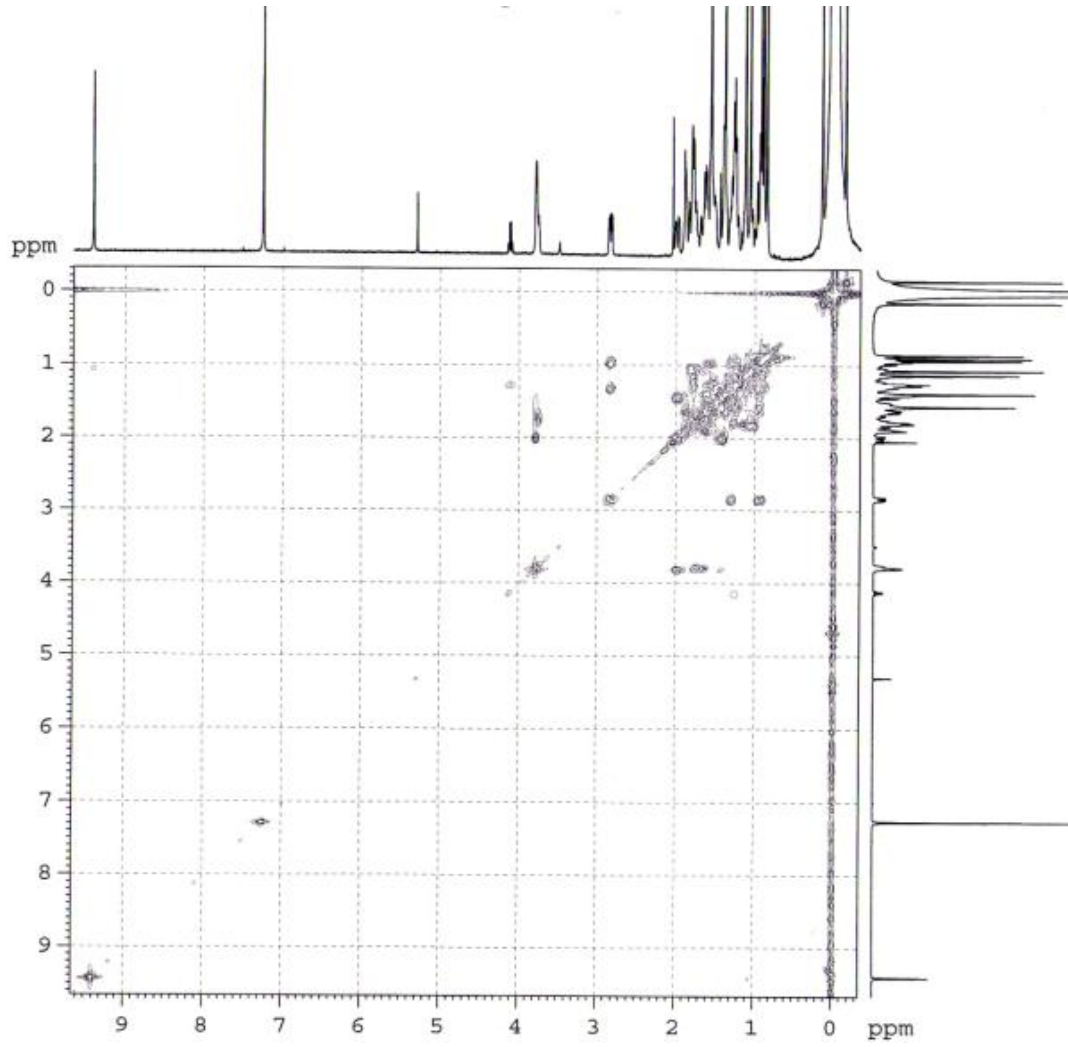
### Anexo F3: Espectro DEPT 135



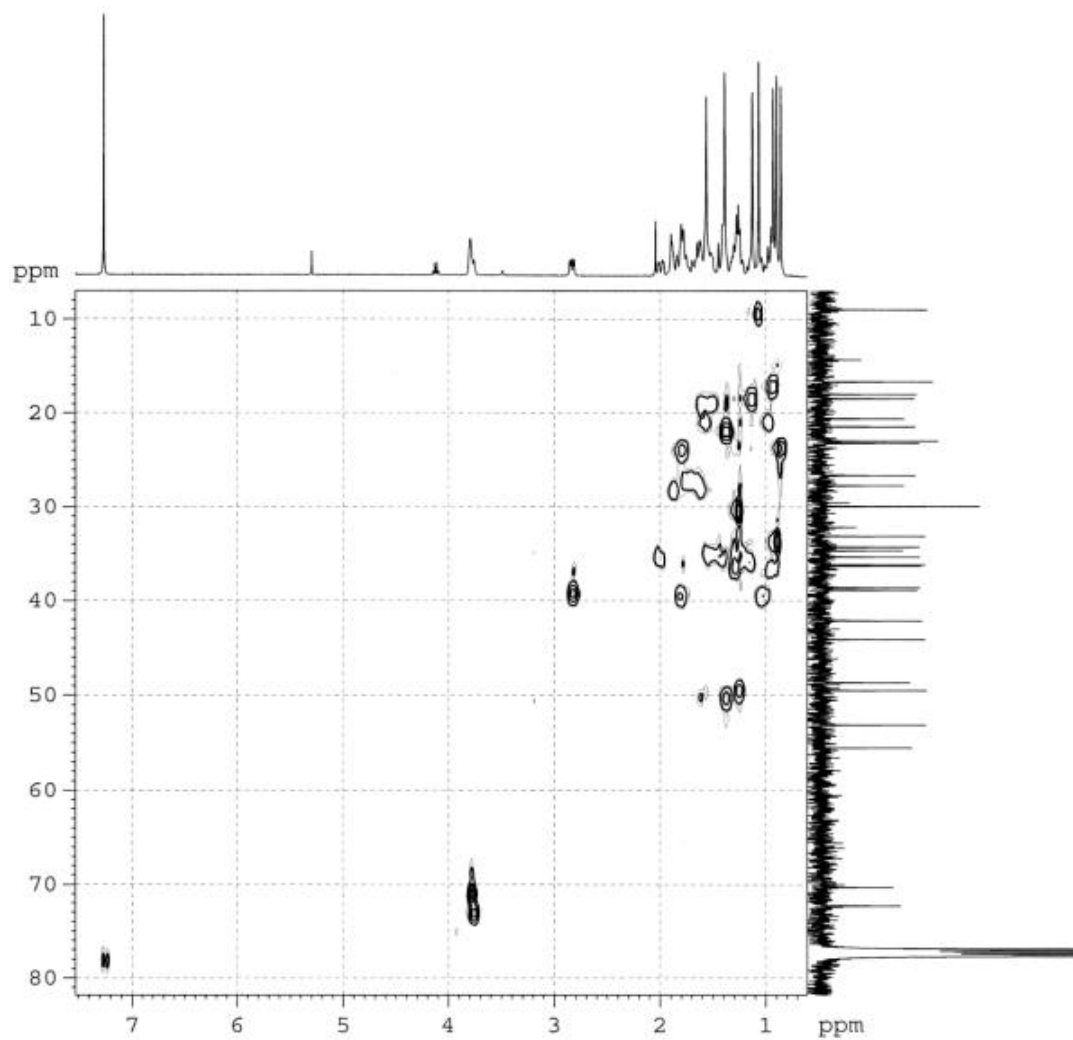
Current Data Parameters  
 EXPNO 3  
 PROCNO 1  
 F2 - Acquisition Parameters  
 Date\_ 20090907  
 Time 14:18  
 PROBNM 1418  
 PROCNO 3  
 PULPROG 5 mm Multic  
 DEPT135  
 TD 65536  
 SOLVENT CDCl3  
 NS 3584  
 DS 4  
 SMH 17123.287 Hz  
 FIDRES 0.261281 Hz  
 AQ 1.9137012 sec  
 RG 10324.0  
 DE 29.750 usec  
 TE 300.0 K  
 CNST2 145.0000000  
 d1 2.0000000 sec  
 d12 0.0002000 sec  
 DELTA 0.0002165 sec  
 ===== CHANNEL f1 =====  
 NUC1 13C  
 P1 17.00 usec  
 P2 34.00 usec  
 PL1 3.00 dB  
 SFO1 100.6210192 MHz  
 ===== CHANNEL f2 =====  
 CPDPRG2 waltz16  
 NUC2 1H  
 P3 9.20 usec  
 P4 18.40 usec  
 P5 3.00 usec  
 PL2 3.00 dB  
 PL12 22.81 dB  
 SFO2 400.1316005 MHz  
 F2 - Processing parameters  
 SI 32768  
 SF 100.6137690 MHz  
 MDW 0  
 SSB 0  
 GB 1.00 Hz  
 PC 1.00



Anexo F4: Espectro COSY

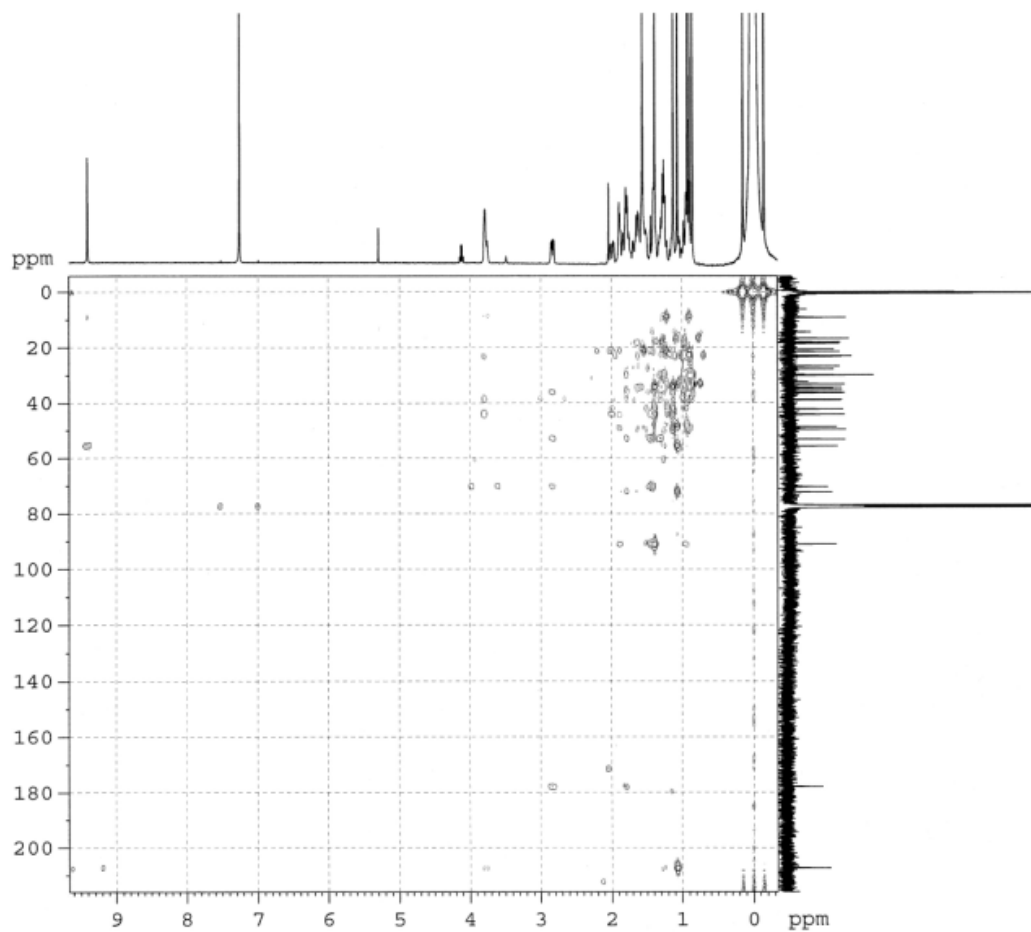


Anexo F5: Espectro HSQC



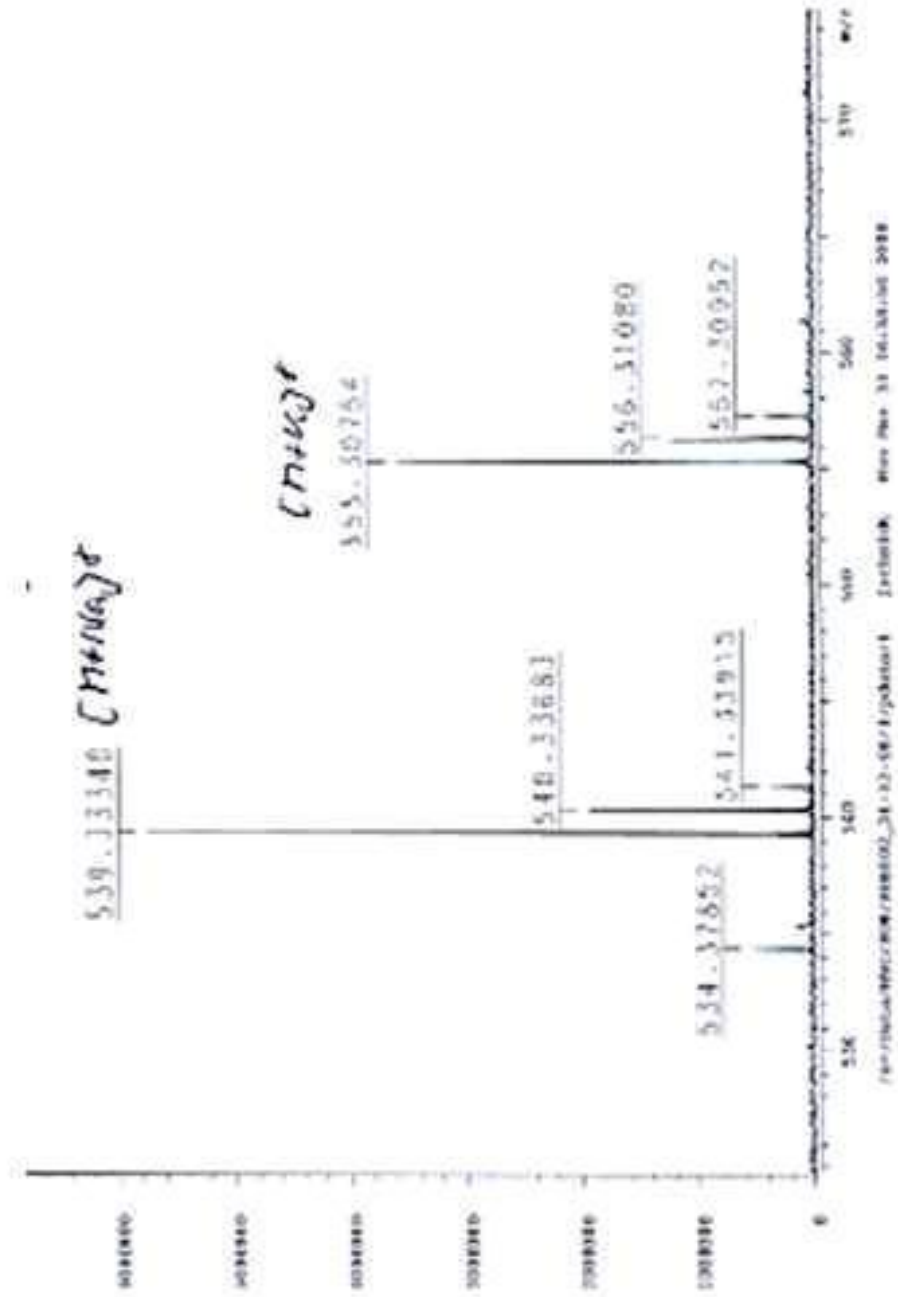


**Anexo F6: Espectro HMBC**

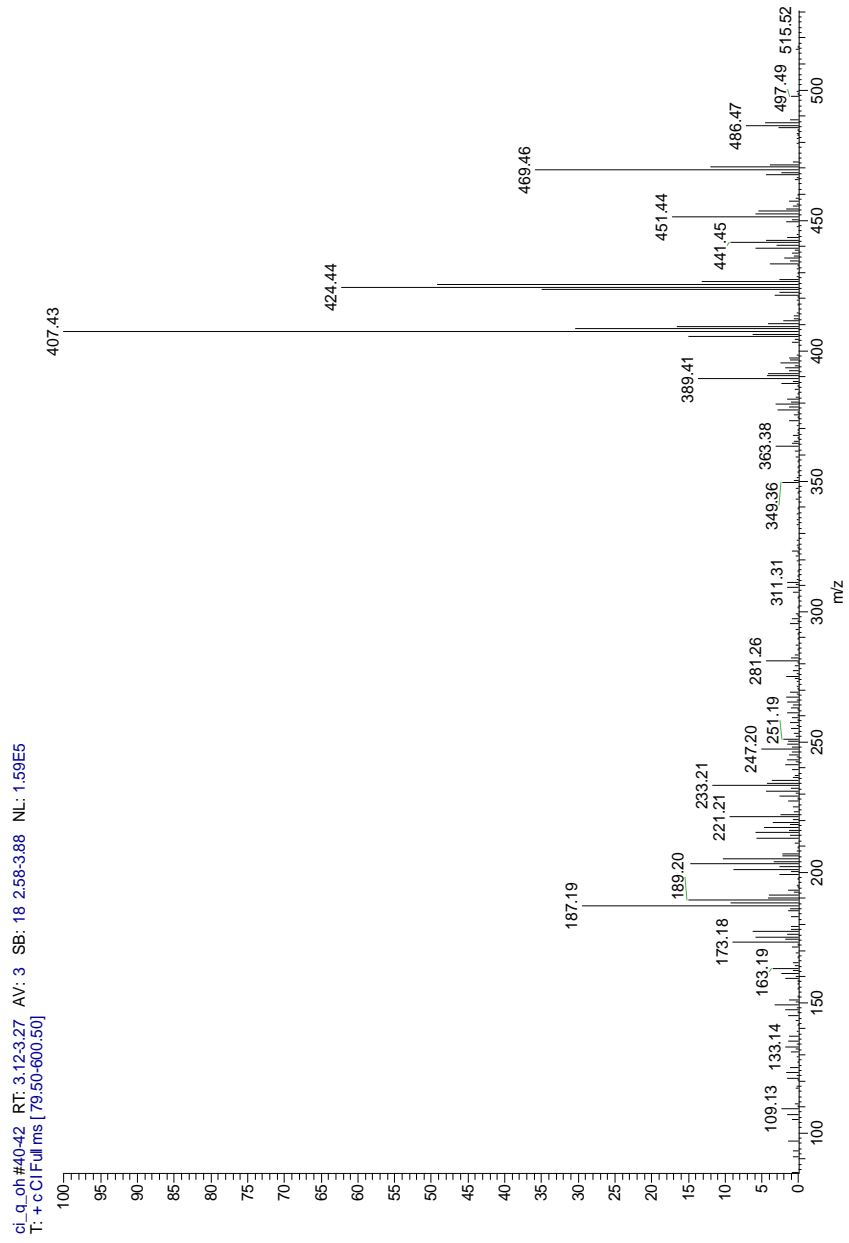




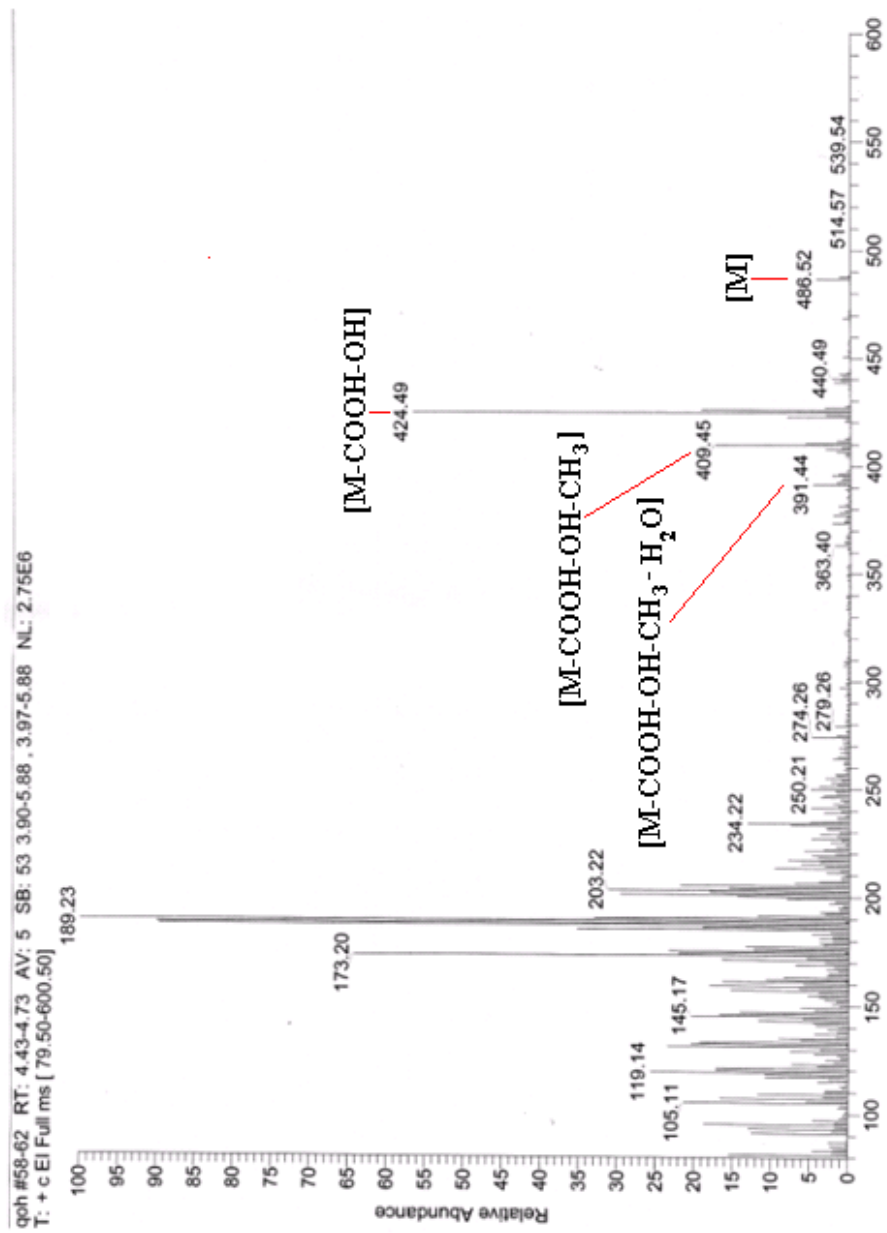
Anexo G2: Espectro de masa de ionización química de Qy5



### Anexo G3: Espectro de masa de ionización química de Qy6



Anexo G4: Espectro de masa de impacto electrónico de Qy6



Anexo G5: Espectro de masa de ionización química de Qy3

