



Universidad de Chile
Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas
Departamento de Química Farmacológica y Toxicológica

EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD INHIBITORIA DE
 α -GLUCOSIDASA DE LOS EXTRACTOS DE HOJAS DE DIEZ
GENOTIPOS DE *UGNI MOLINAE* TURCZ. Y DETERMINACIÓN
DEL TIPO DE INHIBICIÓN

Memoria para optar al título de Químico Farmacéutico

RUBÉN ELÍAS VEAS ALBORNOZ

PROFESOR PATROCINANTE
DRA. CARLA DELPORTE
VERGARA
Dpto. de Química Farmacológica y
Toxicológica

DIRECTOR DE MEMORIA
DRA. CARLA DELPORTE
VERGARA
Dpto. de Química Farmacológica y
Toxicológica

SANTIAGO – CHILE
2016

***A mis padres
y hermana***

AGRADECIMIENTOS

Quiero partir agradeciendo profundamente a mis padres María Albornoz L. y Alberto Veas R., pilares fundamentales y motivo por el cual me encuentro hoy a pasos de convertirme en un profesional. Agradecerles por siempre estar presentes y motivarme a cumplir mis sueños, son un verdadero ejemplo a seguir, los amo mucho.

Le agradezco a mi hermana Vania Veas A. por ser el regalo más grande que me pudieron dar mis padres, por su preocupación y porque gracias a ella inconscientemente pude enmarcar mi camino y superar este peldaño de los sueños cumplidos, por estar a mi lado en las buenas y en las malas, por amarme como yo a ella, muchas gracias.

Quiero agradecer también a las personas que no me acompañan físicamente, pero que siempre están presentes en mi mente y corazón, mis abuelos María Lizama L., María Riquelme G., Carlos Albornoz D. y Rene Veas G., que por cosas del destino, hoy estoy estudiando una de las cosas que ellos más cuidaban, sus plantas y flores. Sé que no es el azar, donde quiera que estén les mando mi gratitud. Pase lo que pase, siempre los llevo conmigo.

Agradezco a toda mi familia por siempre estar conmigo, apoyarme y estimular mi desarrollo y crecimiento, gracias por estar siempre presentes y por permitirme contar con Uds. Especialmente quiero agradecer a mis primos Braulio Albornoz M., Ana Paz Albornoz A., Camila Albornoz B., porque más que primos son mis hermanos y así lo he sentido siempre. Agradezco también a Mauricio Albornoz L., por apoyarme en el momento que necesite de su ayuda, así como también a la familia Albornoz Padilla por aceptarme en su hogar en el momento que lo requerí.

Quiero agradecer a las personas que me han acompañado durante este largo camino partiendo por mis amigos de la infancia, con los que crecí y desarrollé,

Nayareth Ibáñez L., Valentina Ríos F., Gabriela Pérez C., Víctor Avilés por siempre motivarme, confiar y creer en mí y en mis capacidades. A las amistades que adquirí en la Universidad, Skarlett Pincol C., Javiera Suazo A., Marcela Yáñez L., Paula Valenzuela B., Camila Chávez P., Rodrigo Pérez A., por estar presentes en este camino que emprendimos el año 2009, obsequiarme los mejores momentos de mi estadía en la Universidad y por el compañerismo que siempre he sentido de su parte. Espero sigamos cultivando nuestra amistad.

Agradezco infinitamente al Laboratorio de Productos Naturales de la Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas de la Universidad de Chile, por aceptarme y hacerme sentir parte de Uds., ser un miembro más de su familia y permitirme compartir con Uds. Gabriela Valenzuela, Marcelo Peña, Jorge Arancibia, Catalina Figueroa, Daniela Jara, Alejandrina Alucema, Zita Avello, Diana Figueroa, Ítalo Bugueño, Paola Guzmán y David Aravena. Agradezco especialmente a la Profesora Dra. Carla Delporte V. por apoyarme sin condiciones, permitirme trabajar en su laboratorio y guiarme por el mejor camino para cumplir mis metas, nunca dejare de estar feliz y agradecido por todo lo que han hecho por mí, sus consejos y enseñanzas.

Para finalizar quiero agradecer de todo corazón a todas y cada una de las personas que han formado parte de mi vida. Un simple gesto, un saludo, una mínima acción son suficientes para forjar el camino que me han llevado hasta el punto en el que me encuentro, soy un convencido de que sin Uds. mi vida no sería lo que es hoy. Quisiera destacar en este agradecimiento a la profesora Dra. Lorena García y al profesor Dr. Marcelo Kogan por prestarme la ayuda y el apoyo que necesitaba para iniciar una de las etapas más importantes de mi vida y a Valentina Zuñiga por formar parte de mi vida pese a que hoy ya no estés presente en ella.

Muchas Gracias

FINANCIAMIENTO

Esta memoria fue financiada por el proyecto FONDECYT N° 1130155, dirigido por la Dra. Carla Delporte Vergara

ÍNDICE GENERAL

ÍNDICE DE TABLAS	III
ÍNDICE DE FIGURAS.....	IV
ÍNDICE DE ANEXOS.....	VI
ABREVIATURAS	VII
RESUMEN.....	IX
ABSTRACT	X
1. INTRODUCCIÓN.....	1
1.1. MURTILLA.....	1
1.1.1. Ácidos triterpénicos pentacíclicos	3
1.1.2. Polifenoles	4
1.2. DIABETES MELLITUS TIPO 2 (DMT2)	5
1.2.1. α -glucosidasa.....	8
2. HIPÓTESIS.....	10
3. OBJETIVOS	11
3.1. OBJETIVO GENERAL.....	11
3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	11
4. MATERIALES Y MÉTODOS	12
4.1. REACTIVOS.....	12
4.2. MATERIAL VEGETAL	12
4.3. ESTUDIOS QUÍMICOS	13
4.3.1. Preparación de los extractos.....	13
4.4. ESTUDIOS FARMACOLÓGICOS.....	14
4.4.1. Actividad inhibitoria frente α -glucosidasa	14
4.4.1.1. Preparación de soluciones.....	16

4.4.2. <i>Cinética de inhibición de α-glucosidasa</i>	18
4.4.2.1. Preparación de soluciones.....	20
4.5. ANÁLISIS ESTADÍSTICO.....	21
5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	22
5.1. ESTUDIOS QUÍMICOS	22
5.1.1. <i>Rendimiento de los extractos</i>	22
5.2. ESTUDIOS FARMACOLÓGICOS.....	23
5.2.1. <i>Actividad Inhibitoria frente a α-glucosidasa</i>	23
5.2.2. <i>Comparación con ensayos de actividad antioxidante</i>	32
5.2.2.1. Actividad inhibitoria de α -glucosidasa y efectividad antioxidante	32
5.2.2.2. Actividad inhibitoria de α -glucosidasa y poder antioxidante reductor del hierro	33
5.2.2.3. Actividad inhibitoria de α -glucosidasa y capacidad de absorción de radicales de oxígeno	34
5.2.3. <i>Comparación con otros ensayos enzimáticos</i>	35
5.2.3.1. Actividad inhibitoria de α -glucosidasa y de la glicógeno fosforilasa a	35
5.2.3.2. Actividad inhibitoria de α -glucosidasa y de la proteína tirosina fosfatasa 1B	36
5.3. CINÉTICA DE INHIBICIÓN DE α -GLUCOSIDASA	37
6. CONCLUSIONES.....	43
7. REFERENCIAS	44

ÍNDICE DE TABLAS

TABLA 1: ÁCIDOS TRITERPÉNICOS PENTACÍCLICOS PRESENTES EN DISTINTOS EXTRACTOS DE HOJAS DE MURTILLA	3
TABLA 2: GENOTIPOS Y NÚMEROS DE REGISTRO DE LOS TESTIGOS HERBARIOS.....	12
TABLA 3: PROTOCOLO DEL ENSAYO DE INHIBICIÓN DE α -GLUCOSIDASA	15
TABLA 4: PROTOCOLO DEL ENSAYO DE CINÉTICA DE INHIBICIÓN DE α -GLUCOSIDASA .	19
TABLA 5: RENDIMIENTO DE LOS EXTRACTOS DE HOJAS DE MURTILLA EN LA EXTRACCIÓN SERIADA	22
TABLA 6: PORCENTAJES DE INHIBICIÓN DE LOS EETs FRENTE A α -GLUCOSIDASA	23
TABLA 7: PORCENTAJES DE INHIBICIÓN DE LOS EAES FRENTE A α -GLUCOSIDASA	24
TABLA 8: CI_{50} FRENTE A α -GLUCOSIDASA DE LOS EETs Y EAES DE HOJAS DE DIEZ GENOTIPOS DE MURTILLA	26
TABLA 9: CI_{50} DE LOS COMPUESTOS AISLADOS PRESENTES EN LOS EAES Y EETs DE HOJAS DE MURTILLA.....	27
TABLA 10: VELOCIDADES INICIALES DE LOS EXTRACTOS MÁS POTENTES Y CONTROL .	37
TABLA 11: CAMBIOS EN LOS VALORES DE LAS CONSTANTES CINÉTICAS	40

ÍNDICE DE FIGURAS

FIGURA 1: <i>UGNI MOLINAE</i> TURCZ. (MYRTACEAE) – INSTITUTO DE INVESTIGACIONES AGROPECUARIAS	2
FIGURA 2: ESTRUCTURA QUÍMICA DE LOS ÁCIDOS TRITERPÉNICOS PENTACÍCLICOS	3
FIGURA 3: POLIFENOLES ENCONTRADOS EN DISTINTOS EXTRACTOS DE HOJAS DE MURTILLA.....	5
FIGURA 4: ESQUEMA DE EXTRACCIÓN SERIADA DE LAS HOJAS DE CADA GENOTIPO DE MURTILLA.....	13
FIGURA 5: ESQUEMA DE LLENADO DE LA MICROPLACA PARA EL ENSAYO DE INHIBICIÓN	15
FIGURA 6: ESQUEMA DE LLENADO DE LA MICROPLACA PARA EL ENSAYO DE CINÉTICA DE INHIBICIÓN	20
FIGURA 7: % INHIBICIÓN VS LOG(C) DE LOS EET, EAE Y ACARBOSA.....	25
FIGURA 8: COMPARACIÓN Y CORRELACIÓN ENTRE LAS CI_{50} FRENTE A LA α -GLUCOSIDASA Y TERPENOIDES PRESENTES EN LOS EETS Y EAES DE HOJAS DE MURTILLA.....	30
FIGURA 9: COMPARACIÓN DE LAS CI_{50} FRENTE A LA α -GLUCOSIDASA Y CFT, CONTENIDO DE FLAVONOIDES Y ÁCIDO GÁLICO DE LOS EETS	31
FIGURA 10: COMPARACIÓN DE LAS CI_{50} Y EFECTIVIDAD ANTIOXIDANTE DE LOS EETS DE MURTILLA	32
FIGURA 11: COMPARACIÓN DE LAS CI_{50} Y FRAP DE LOS EETS.....	33
FIGURA 12: COMPARACIÓN DE LAS CI_{50} Y ORAC-FL DE LOS EAES Y EETS	34
FIGURA 13: COMPARACIÓN DE LAS CI_{50} Y GPA DE LOS EAES Y EETS.....	35
FIGURA 14: COMPARACIÓN DE LAS CI_{50} Y %INHIBICIÓN DE PTP1B DE LOS EAES Y EETS.....	36
FIGURA 15: CINÉTICA DE MICHAELIS-MENTEN DE LOS EXTRACTOS MÁS POTENTES Y ACARBOSA.....	38

FIGURA 16: GRÁFICA DE LINEWEAVER-BURK DE LOS EXTRACTOS MÁS POTENTES Y ACARBOSA	39
FIGURA 17: DIAGRAMAS DE INTERACCIÓN ENZIMA-SUSTRATO-INHIBIDOR SEGÚN TIPO DE INHIBICIÓN	41

ÍNDICE DE ANEXOS

ANEXO 1. FOTOGRAFÍAS DE LOS TESTIGOS HERBARIOS DE LOS DIEZ GENOTIPOS DE <i>U. MOLINAE</i> GUARDADOS EN EL LABORATORIO DE PRODUCTOS NATURALES DE LA FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS Y FARMACÉUTICAS DE LA UNIVERSIDAD DE CHILE.....	50
ANEXO 2. CURVAS %INHIBICIÓN VERSUS LOG(C) Y SUS RESPECTIVAS FUNCIONES ...	52
ANEXO 3. ANALISIS DE VARIANZA DE LOS EAES Y EETS.....	54
ANEXO 4. CORRELACIÓN DE LOS TERPENOIDES CUANTIFICADOS Y LAS CI_{50}	55
ANEXO 5. CORRELACIÓN DEL CONTENIDO DE FENOLES Y LAS CI_{50} DE LOS EETS	55
ANEXO 6. CURVAS DE PROGRESIÓN DE ACARBOSA Y EXTRACTOS MÁS POTENTES FRENTE A A-GLUCOSIDASA	57
ANEXO 7. RESÚMENES DE CONGRESOS ASISTIDOS.....	58

ABREVIATURAS

%I:	Porcentaje de inhibición
A:	Absorbancia
AA:	Ácido asiático
AAL:	Ácido alfitólico
AC:	Ácido corosólico
AG:	Ácido gálico
AM:	Ácido madecásico
AML:	Ácido maslínico
ANOVA:	<i>Analysis of variance</i>
AO:	Ácido oleanólico
AU:	Ácido ursólico
B:	Blanco
C:	Control
CFT:	Contenido fenólico total
CI ₅₀ :	Concentración inhibitoria 50%
CN:	Control negativo
CNE:	Control no enzimático
CP:	Control positivo
DE:	Desviación estándar
DMSO:	Dimetilsulfóxido
DMT2:	Diabetes mellitus tipo 2
DPPH:	<i>2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl</i>
E:	Enzima
EA:	Efectividad antioxidante
EAE(s):	Extracto(s) de acetato de etilo
EDCM(s):	Extracto(s) de diclorometano
EET(s):	Extracto(s) etanólico(s)
EH(s):	Extracto(s) de hexano

ES:	Extracto seco
F:	Flavona(s)
FL:	Flavonol(es)
FN:	Flavanona(s)
FRAP:	<i>Ferric reduction antioxidant power</i>
I:	Inhibidor
(I)GPa:	(Inhibición de) Glicógeno fosforilasa a
INIA:	Instituto de investigaciones agropecuarias
(I)PTP1B:	(Inhibición de) Proteína tirosina fosfatasa 1B
K_m (*):	Constante(s) de Michaelis-Menten (aparente(s))
Log(C):	Logaritmo de la concentración
M:	Muestra
NADPH:	Nicotinamida adenina dinucleótido fosfato
NaOH:	Hidróxido de sodio
ORAC-FI:	<i>Oxygen radicals antioxidant capacity-fluorescein</i>
pNPG:	p-Nitrofenil- α -D-glucopiranosido
Q:	Quercetina
r:	Coefficiente de correlación de Pearson
R^2 :	Coefficiente de determinación
RI:	Resistencia a la insulina
S:	Sustrato
TT:	Terpenoides totales
UA:	Unidades de absorbancia
V_o :	Velocidad(es) inicial(es)
V_{max} (*):	Velocidad(es) máxima(s) (aparente(s))

RESUMEN

Ugni molinae Turcz., Myrtaceae conocida normalmente como murta o murtillo es un arbusto nativo siempre-verde del centro-sur y sur de Chile. La medicina folclórica le atribuye muchas propiedades y entre sus usos destaca como tratamiento para la diabetes al consumir la infusión de sus hojas y ramas. Se han demostrado la presencia de ácidos triterpénicos pentacíclicos y polifenoles en los extractos de murtillo con potente actividad inhibitoria de α -glucosidasa. Su inhibición permite la disminución del *peak* postprandial de glucosa al retardar y disminuir la absorción de monosacáridos.

El objetivo de este estudio fue comparar la actividad inhibitoria de α -glucosidasa de extractos etanólicos (EETs) y acetato de etilo (EAEs) de hojas de 10 genotipos de *U. molinae* cultivadas en las mismas condiciones edafoclimáticas y manejo agronómico y determinar su mecanismo de inhibición.

El estudio se llevó a cabo mediante el método espectrofotométrico de inhibición de α -glucosidasa utilizando pNPG como sustrato, descrito previamente por Kim *et al.* (2001) con las modificaciones correspondientes. Los resultados sugieren que los extractos más potentes corresponden a los EET 23-2 y EAE 27-1 observándose diferencias significativas en un 70% y un 60% de los genotipos respectivamente con valores de CI_{50} de $1,12 \pm 0,07$ y $8,20 \pm 0,20$ $\mu\text{g/mL}$. Sin embargo todos los extractos fueron más potentes que acarbosa, fármaco de referencia ($CI_{50} = 251,0 \pm 34,0$ $\mu\text{g/mL}$). Además el genotipo 23-2 para ambos extractos presentó un comportamiento de inhibidor acompetitivo y el genotipo 27-1, de inhibidor no competitivo mixto, evaluados por la gráfica de Lineweaver-Burk y los cambios en sus constantes cinéticas.

Se concluye que los genotipos difieren en potencia y tipo de inhibición debido al factor genético. En general los genotipos 23-2 y 27-1 que no presentan diferencias con los genotipos 19-1 y 14-4 poseen buenas proyecciones *in vivo* para el potencial tratamiento de DMT2, dada sus actividades antioxidantes e inhibitoras de enzimas claves en la DMT2 *in vitro*.

ABSTRACT

Inhibitory activity evaluation of α -glucosidase from leaves extracts of ten *Ugni molinae* Turcz. genotypes and inhibition type determination

Ugni molinae Turcz., Myrtaceae generally known as murta or murtilla is an evergreen shrub native of south-central and southern Chile. Folk medicine attributes many properties and among its uses include as a treatment for diabetes by consuming the infusion of its leaves and branches. It has demonstrated the presence of pentacyclic triterpenic acids and polyphenols in murtilla extracts with potent inhibitory activity of α -glucosidase. Its inhibition allows decreasing the postprandial glucose peak by decreasing the absorption of monosaccharides.

The aim of this study was to compare the inhibitory activity of α -glucosidase from ethanolic (ETEs) and ethyl acetate (EAEs) leaves extracts of 10 *U. molinae* genotypes grown in the same soil and climatic conditions and agronomic management and determine its mechanism of inhibition.

The study was performed by the spectrophotometric method of inhibiting α -glucosidase using pNPG as substrate, previously described by Kim *et al.* (2001) with appropriate modifications. The results suggest that ETE 23-2 and EAE 27-1 are more potent with significant differences about 70% and 60% of the genotypes respectively with IC_{50} values of 1.12 ± 0.07 and 8.20 ± 0.20 $\mu\text{g/mL}$. However all extracts were more potent than acarbose, reference drug ($IC_{50} = 251.0 \pm 34.0$ $\mu\text{g/mL}$). Besides for both extracts the 23-2 genotype present uncompetitive inhibitor behavior and genotype 27-1, mixed noncompetitive inhibitor, evaluated by the Lineweaver-Burk and changes in their kinetic constants.

It is concluded that genotypes differ in power and inhibition type due to genetic factor. In general 23-2 and 27-1 genotypes not show differences with 19-1 and 14-4 genotypes possess good *in vivo* projections for the potential treatment of T2DM, due to its *in vitro* antioxidant and inhibiting activities of key enzymes in T2DM.

1. Introducción

1.1. Murtila

La murtila aunque ha sido originalmente llamada *Myrtus ugni* Mol., actualmente es conocida como *Ugni molinae* Turcz., pertenece a la familia de las Myrtaceae y también se le conoce por sus nombres comunes murta, murtillo, uñi (üñü nombre indígena, mapuche) *chilean cranberry* y *chilean guava* (Wilhem de Mösbach, 1992; Montenegro, 2002) es un arbusto nativo perenne (siempre verde), de forma variable según disponibilidad de agua que alcanza hasta los dos metros en zonas de alta pluviosidad; posee hojas pecioladas, opuestas, sin estípulas, aovado-oblongas, con el ápice agudo en forma de lanza, verdes por encima, glaucas (de un verde más claro) y con puntuaciones por el envés que reflejan las glándulas presentes; de 2 a 2,5 cm de longitud; sus ramas nuevas presentan entrenudos cortos, hojas comprimidas y se encuentran cubiertas de vellos. Sus flores péndulas, solitarias y axilares presentan cinco sépalos unidos en base y cinco pétalos, estambres numerosos y un estilo más largo. Los frutos son bayas globosas con gran cantidad de semillas (Figura 1); carnosos, dulces y aromáticos con restos de cálices pentámeros y tetrámeros (Hoffmann, 2005).

Crece desde la VI región hasta el río Palena en la X región. Habita principalmente en la cordillera de la costa formando parte de bosques. Crece preferentemente en quebradas donde la humedad es más alta, aunque es frecuente en terrenos abiertos y degradados así como en las orillas de bosques (Montenegro, 2002).



Figura 1: *Ugni molinae* Turcz. (Myrtaceae) – Instituto de Investigaciones Agropecuarias

La medicina folclórica chilena atribuye a las partes aéreas de esta especie propiedades astringentes, estimulantes y aromáticas, y se cree útil en el tratamiento de enfermedades del tracto urinario (Aguirre *et al.*, 2006), además esta especie de la familia de las Myrtaceae se ha usado como analgésico para distintos tipos de dolor y como anti-inflamatorio (Delporte *et al.*, 2007). El extracto de hojas de la planta es usado en cosméticos para descongestionar y regenerar la piel y neutralizar el estrés oxidativo retardando los signos del envejecimiento (Aguirre *et al.*, 2006). Las infusiones preparadas con ramas y hojas de murta han sido consumidas para el tratamiento de la diabetes (Rubilar *et al.* 2011), por lo cual ha sido objeto de diversos estudios incluyendo el actual.

Un estudio de variabilidad genética, realizado en 45 accesiones de murtila recolectada en una amplia zona del sur de Chile, a través de la técnica de ADN polimórfico amplificado al azar (RAPD de su nombre en inglés *Random Amplified Polimorphyc DNA*) observó ausencia de homología en las accesiones, incluso esta se observó en accesiones recolectadas en un mismo sitio geográfico. El estudio sugiere que la heterogeneidad morfológica de la especie podría resultar de la aparentemente fácil polinización cruzada (47%), o xenogamia (Seguel *et al.* 1999; Seguel *et al.* 2000).

1.1.1. Ácidos triterpénicos pentacíclicos

Los ácidos triterpénicos pentacíclicos son una clase de compuestos isoprenoides de 30 carbonos, ampliamente presentes en plantas, producidos biosintéticamente por plegado y ciclación del escualeno (Babalola y Shode, 2013). Estudios realizados en nuestro laboratorio han demostrado la presencia de ácidos triterpénicos pentacíclicos como: ácidos betulínico, ursólico, oleanólico, incluyendo 2 α -hidroxi derivados como los ácidos: alfitólico, asiático, corosólico, madecásico y maslínico (Tabla 1) responsables de la actividad anti-inflamatoria, en distintos extractos seriados de hojas de murtila silvestre. Dichos compuestos fueron identificados por RMN y por cromatografía de líquidos de alta eficiencia acoplada a detector de UV y a espectrómetro de masas por ionización electrospray en tándem, CLAE-UV-IES-MSn (Aguirre *et al.*, 2006; Goity *et al.*, 2013).

Tabla 1: Ácidos triterpénicos pentacíclicos presentes en distintos extractos de hojas de murtila

Núcleo Ursano (Figura 2.a)			
Ácido	R ₁	R ₂	R ₃
Ursólico	-H	-CH ₃	-H
Corosólico	-OH	-CH ₃	-H
Asiático	-OH	-CH ₂ OH	-H
Madecásico	-OH	-CH ₂ OH	-OH
Núcleo Lupano (Figura 2.b)			
Ácido	R ₁		
Betulínico	-H		
Alfitólico	-OH		
Núcleo Oleanano (Figura 2.c)			
Ácido	R ₁		
Oleanólico	-H		
Maslínico	-OH		

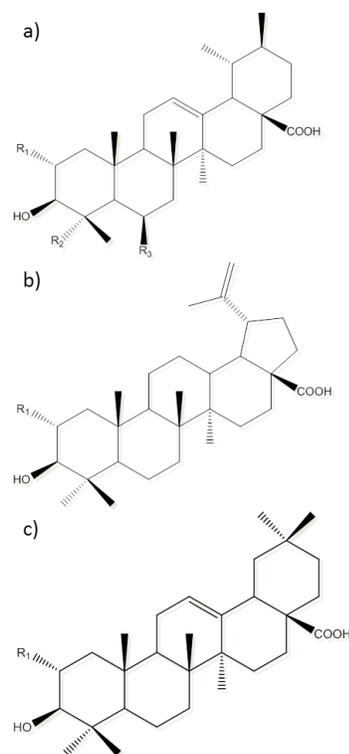


Figura 2: Estructura química de los ácidos triterpénicos pentacíclicos

1.1.2. Polifenoles

Los polifenoles son metabolitos secundarios de plantas y están generalmente involucrados en la defensa contra la radiación ultravioleta o agresiones por patógenos. Derivan de un intermediario común, la fenilalanina, o un precursor cercano, el ácido shikímico. Principalmente se encuentran en sus formas conjugadas con uno o más residuos de azúcares (heterósidos) unidos a los grupos hidroxilos, aunque también se pueden encontrar uniones directas del azúcar a un carbón aromático. Se pueden clasificar en función del número de anillos fenólicos que contienen o sobre la base de sus elementos estructurales, destacando: los ácidos fenólicos, flavonoides, taninos, estilbenos y lignanos (Pandey y Rizvi, 2009).

Algunos estudios han reportado la presencia de taninos derivado de la catequina y del ácido gálico y de compuestos polifenólicos como: ramnósido, diramnósido y glucósido de miricetina, glucósido de quercetina y canferol junto con las geninas miricetina, quercetina y epicatequina además de ácido gálico (Figura 3) en extractos acuosos e hidroalcohólicos de murtila, identificados mediante cromatografía líquida de alta eficiencia acoplado a un espectrómetro de masa, CLAE-MS y por cromatografía líquida de alta eficiencia acoplado a detector de arreglo de diodos, CLAE-DAD (Rubilar *et al.*, 2006; Avello *et al.*, 2013).

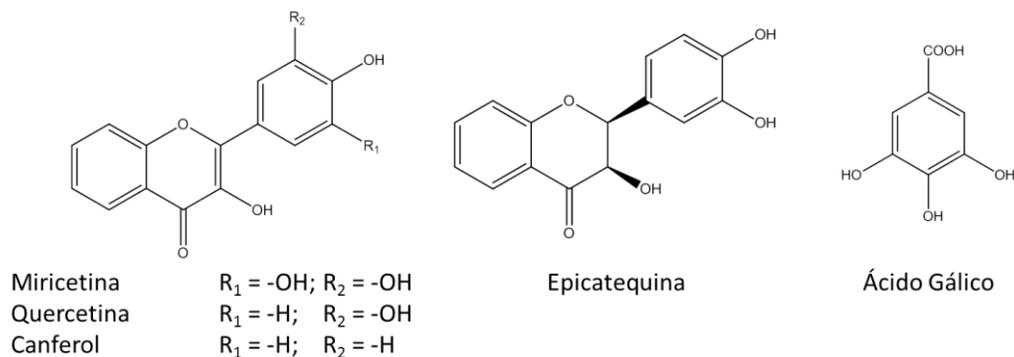


Figura 3: Polifenoles encontrados en distintos extractos de hojas de murtilla

1.2. Diabetes mellitus tipo 2 (DMT2)

El estado de hiperglicemia crónica define a la DMT2, condición que conlleva daño a nivel microangiopático (retinopatía, nefropatía y neuropatía) y macrovascular (enfermedad isquémica del corazón, ataque cerebral y enfermedad vascular periférica). La DMT2 se asocia a una reducción en la expectativa de vida, aumento del riesgo de complicaciones y de eventos mórbidos relacionados con las complicaciones crónicas, disminución en la calidad de vida y aumento en los costos. La prevalencia de DMT2 en nuestro país se estima entre 4,2% y 7,5%. En Chile sobre el 85% de las personas que tiene diabetes conoce su condición; el problema radica en que un bajo porcentaje de las personas afectadas (entre un 17,6 y 19,7%) está bien controlada, es decir, en un estado de euglicemia (MINSAL, 2010).

La DMT2 es una enfermedad heterogénea, compleja, interrelacionada que involucra etiologías multigénicas. Las alteraciones clásicas en esta condición son caracterizadas por la combinación de resistencia a la insulina (RI), deterioro progresivo de las células β que resulta en una secreción y liberación de insulina alterada y aumento en la producción de glucosa hepática como resultado del aumento de la glucogenólisis y consecuentemente un aumento de la glicemia.

Alteraciones de diferentes vías de señalización y de daño a nivel celular pueden ser provocadas por la hiperglicemia, activándose ya sea por un efecto tóxico directo, por sus derivados metabólicos y productos, o debido a los efectos continuos sobre las vías de señalización especialmente a nivel celular causado por los metabolitos de la glucosa, como las que se indican a continuación:

- i) Formación de productos finales de glicación avanzada (AGEs de su nombre en inglés *advance glycation end-products*) por oxidación intracelular de glucosa, compuestos de fragmentación de fosfatos y la descomposición de aductos de lisina derivados de desoxifruktosa (productos de Amadori), que luego reaccionan con grupos aminos de diversas proteínas celulares.
- ii) Estrés oxidativo debido al aumento de especies reactivas de oxígeno/nitrógeno (EROs/ERNs) a través de reacciones tanto enzimáticas como no enzimáticas. El estrés oxidativo resulta de un desbalance entre EROs/ERNs y las defensas celulares endógenas.
- iii) Activación de las isoformas de proteína quinasa C (PKC, *protein kinase C*), grupo de proteínas dependientes de fosfolípidos. Estas proteínas median diferentes respuestas celulares a hormonas, neurotransmisores y factores de crecimiento, subsecuentemente juegan un rol clave en la regulación de la liberación de vasodilatadores, activación endotelial y otras funciones celulares importantes e incrementando la producción de diacilglicerol (DAG). Además contribuyen a la aparición de complicaciones cardiovasculares por activación de oxidasas dependientes de NADPH.
- iv) Actividad de la aldosa reductasa aumentada acumulando sorbitol, disminuyendo los niveles de taurina (potente antioxidante y eliminador de radicales libres) y mioinositol cuya deficiencia se relaciona con la neuropatía clínica responsable de la regeneración alterada de la fibra nerviosa y el daño neurológico asociado con la diabetes, también destruye pericitos, de este modo acelera la retinopatía (aumento permeabilidad y tono colinérgico) y la neuropatía (enlentece la conducción y disminuye el flujo sanguíneo).

Además aumenta el flujo en la vía del poliol, disminuyendo los niveles de NADPH.

- v) Aumento del flujo a través de la vía de la hexosamina, esto desvía fructosa fosfato de la glicolisis para proporcionar sustratos para la formación de glicoproteínas y síntesis de diversos proteoglicanos. Las células β pancreáticas pueden ser especialmente sensible a la activación de la ruta de la hexosamina, resultando en niveles de peróxido de hidrógeno (H_2O_2) intracelular aumentados alterando la liberación de insulina, la RI y promoviendo la disfunción de las células β .
- vi) Sobreproducción del anión superóxido ($O_2^{\cdot-}$) inducido por la cadena transportadora de electrones en la mitocondria. La hiperglicemia puede inducir mutaciones en el ADN mitocondrial por adhesión de monocitos e inhibición de la activación del receptor proliferador de peroxisomas activados, pudiendo ser el mecanismo central subyacente a todas las rutas destructivas responsables del paradigma diabético. (Al-Dallen *et al.*, 2004; Giacco y Brownlee, 2010; Barrientos, 2010; Codario, 2011)

La elevación temprana de la glucosa postprandial en el desarrollo de la DMT2, asociado con la RI progresiva, resulta en una hipertrofia compensatoria de los islotes de células, pero eventualmente la producción de insulina es insuficiente para mantener la euglicemia. En muchas instancias una pérdida o retraso en la fase temprana de liberación de insulina en respuesta a la carga de glucosa a la hora de comer agrava la deficiencia en las células β y contribuye a la naturaleza progresiva de la enfermedad.

Los inhibidores de α -amilasa y α -glucosidasa (acarbose, miglitol y voglibosa) retrasan la absorción de carbohidratos en el tracto gastrointestinal y son efectivos en atenuar la hiperglicemia postprandial. Aunque estos agentes no son extremadamente potentes, pueden ser usados de una forma sinérgica con

otros medicamentos. Además, algunos datos indican que la acarbosa reduce el riesgo de eventos cardiovasculares comparado con placebo (Codario, 2011).

1.2.1. α -glucosidasa

La α -amilasa y α -glucosidasa son enzimas claves en la digestión de carbohidratos. La α -amilasa humana es uno de los principales productos de secreción del páncreas y las glándulas salivares. La actividad de esta enzima es un prerrequisito del proceso de digestión catalizando la ruptura de enlaces α -D-(1-4) glucosídicos del almidón, amilosa, amilopectina, glicógeno y diferentes maltodextrinas generando oligosacáridos más cortos (Lordan *et al.*, 2013).

Las glucosidasas son una clase importante de enzimas que catalizan la hidrólisis de los enlaces glucosídicos en oligosacáridos y glucoconjugados, que están involucradas en diferentes actividades biológicas de importancia relacionadas a desordenes metabólicos y enfermedades como la diabetes, obesidad, enfermedad de depósito lisosomal de glucoesfingolípidos, infección con VIH y tumores. (Chandran *et al.*, 2015).

La α -glucosidasa es una enzima exo-carbohidrasa, que se encuentra localizada en la membrana superficial de las microvellosidades de las células intestinales (enterocitos), cataliza la última etapa del metabolismo de glúcidos mediante la hidrólisis de carbohidratos complejos y disacáridos, de la porción terminal no reductora, a monosacáridos absorbibles provocando así un aumento en los niveles de glucosa en sangre (Lordan *et al.*, 2013; Zhang *et al.*, 2015).

La inhibición de estas enzimas hidrolíticas disminuye el flujo de glucosa desde el tracto intestinal a los vasos sanguíneos resultando en una disminución de la glicemia postprandial. Algunos estudios dan cuenta de la inhibición de α -glucosidasa por compuestos triterpénicos pentacíclicos como los ácidos ursólico, maslínico, corosólico, asiático, oleanólico y sus derivados, retrasando la digestión y provocando un aumento en el tiempo de permanencia de los

carbohidratos, por ende una reducción en la absorción de glucosa (Hou *et al.*, 2009; Alejandro *et al.*, 2013). También se han estudiado los efectos en la inhibición de α -glucosidasa de distintos compuestos fenólicos obtenidos de extractos de propóleos, maqui y murta (Rubilar *et al.*, 2011; Zhang *et al.*, 2015) y de compuestos fenólicos aislados como miricetina, rutina y quercetina (Li *et al.*, 2009; Hyung *et al.*, 2014).

2. Hipótesis

La actividad inhibitoria de la α -glucosidasa y el mecanismo de inhibición de los extractos de acetato de etilo (EAEs) y extractos etanólicos (EETs) de hojas de *U. molinae* Turcz., cultivadas en las mismas condiciones edafoclimáticas y manejo agronómico, está influenciada por el genotipo.

3. Objetivos

3.1. Objetivo general

Evaluar en forma comparativa la actividad inhibitoria de los EAEs y EETs de hojas de diez genotipos de *U. molinae* Turcz. cultivadas en las mismas condiciones edafoclimáticas y manejo agronómico, frente a la enzima α -glucosidasa, identificando el genotipo más potente con potencial uso en el tratamiento de la DMT2 y determinación el tipo de inhibición.

3.2. Objetivos específicos

- Determinar en forma comparativa las concentraciones inhibitorias 50% (CI₅₀) frente a α -glucosidasa de los EAEs y EETs de hojas de los diez genotipos de *U. molinae* Turcz.
- Identificar los genotipos más potentes frente a α -glucosidasa.
- Determinar el tipo de inhibición de los extractos más potentes

4. Materiales y métodos

4.1. Reactivos

La acarbosa, p-nitrofenil- α -D-glucopiranosido (pNPG) y la enzima α -glucosidasa (*Saccharomyces cerevisiae*) fueron adquiridos en Sigma-Aldrich, Chile; el fosfato diácido de sodio monohidrato ($\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$) y el Dimetilsulfóxido (DMSO, CH_3SOCH_3) fueron adquiridos en Merck, Chile; el hidróxido de sodio (NaOH) fue adquirido en Fluka Chemik. Los solventes de extracción grado técnico.

4.2. Material vegetal

A partir de diez accesiones obtenidas desde el banco de germoplasma del Instituto de Investigaciones Agropecuarias (INIA), Carillanca, IX Región, se desarrollaron los cultivos de diez genotipos de *U. molinae* Turcz. en las mismas condiciones edafoclimáticas y manejo agronómico. Se recolectaron hojas de cada uno de los genotipos en el mes de mayo del 2013.

La selección de los diez genotipos se realizó de acuerdo a la cantidad de hojas y calidad de frutos, considerando cinco genotipos por categoría. Se guardaron los testigos herbarios de los diez genotipos en el herbario de la Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas de la Universidad de Chile (Anexo 1) y sus números de registro (Tabla 2).

Tabla 2: Genotipos y números de registro de los testigos herbarios

Selección por cantidad de hojas		Selección por calidad de frutos	
Genotipo	Número	Genotipo	Número
8-2	SQF22571	19-2	SQF22557
14-4	SQF22549	22-1	SQF22553
19-1	SQF22554	23-2	SQF22556
19-1ha	SQF22553	27-1	SQF22555
ZF-18	SQF22550	31-1	SQF22551

4.3. Estudios químicos

4.3.1. Preparación de los extractos

Dos kilogramos de hojas secas y molidas de cada uno de los diez genotipos fueron masados y registrados los valores para posteriormente calcular sus rendimientos en la extracción. En el proceso de extracción seriada (Figura 4) se emplearon solventes de polaridad creciente (hexano, diclorometano, acetato de etilo y etanol) para obtener los respectivos extractos y luego concentrarlos a través de un evaporador rotatorio a presión reducida. Cada extracción se realizó hasta agotar completamente el material vegetal con cada disolvente, el cual fue debidamente secado antes de agregar el siguiente.

Los extractos obtenidos se llevaron a sequedad por medio de una corriente de aire caliente a 30°C y luego se molieron y almacenaron a temperatura ambiente en frascos plásticos etiquetados con el nombre de cada genotipo.

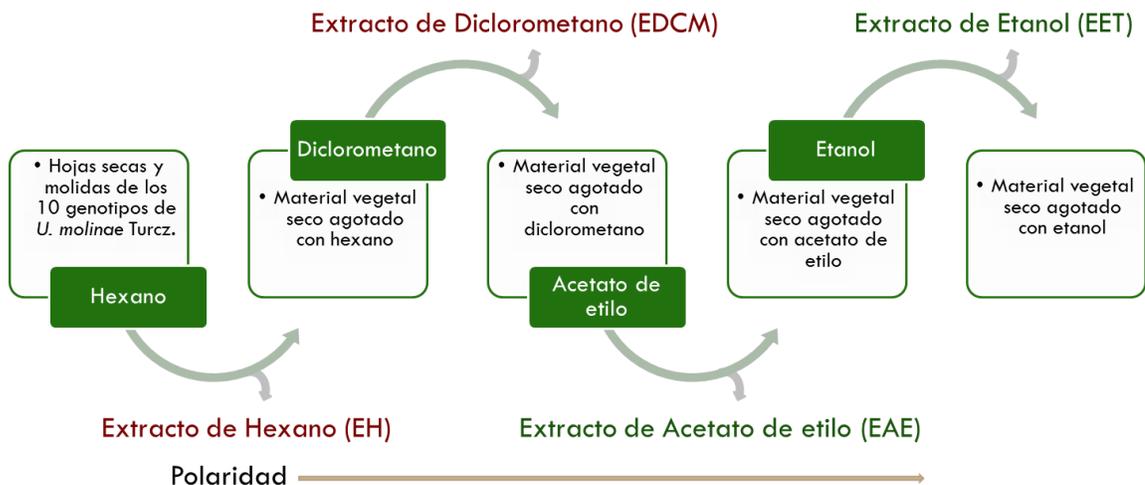


Figura 4: Esquema de extracción seriada de las hojas de cada genotipo de murtila

Los extractos utilizados en esta memoria corresponden a los EAEs y EETs dado que en estudios previos se determinó *in vivo* sus efectos antiinflamatorios en la inflamación inducida por TPA en oreja de ratón, así como sus actividades antioxidantes por los siguientes métodos ORAC-FI, FRAP y DPPH (Arancibia, 2015; Peña, 2015).

4.4. Estudios farmacológicos

4.4.1. Actividad inhibitoria frente α -glucosidasa

El ensayo se llevó a cabo en un espectrofotómetro de microplaca Thermo Scientific® Multiskan® GO, para lo cual se utilizó una placa de 96 pocillos, empleando la metodología descrita por Kim *et al.* (2001) con las modificaciones correspondientes. El medio de reacción consistió en: a) un buffer fosfato 100 mM a pH 6,8 y b) p-Nitrofenil- α -D-glucopiranosido (pNPG) 5 mM. El pNPG, sustrato de la enzima, posee en su estructura una D-glucosa unida por enlace α -glucosídico a un grupo p-nitrofenil, el cual en presencia de la enzima es catalizado por hidrólisis liberando p-nitrofenol, compuesto de naturaleza aromática de color amarillento que absorbe a alrededor de 400 nm. Los extractos a distintas concentraciones en DMSO 11,5% fueron preincubados durante 5 min a 37°C con el medio de reacción, posteriormente se adicionó la solución enzimática 0,1 U/ml (α -glucosidasa de *S. cerevisiae*) para iniciar la reacción. Para los controles negativo y positivo se procedió de la misma forma pero en lugar de extractos se adicionó DMSO 11,5% y acarbosa a distintas concentraciones en DMSO 11,5%, respectivamente. Inmediatamente después de iniciada la reacción se realizó una lectura a 400 nm (0 min) y se incubó por 30 min a 37°C y se realizó la segunda lectura a 400 nm, como lo indica el protocolo (Tabla 3), con el fin de medir la absorbancia solo en el periodo de tiempo descrito en la literatura (30 minutos).

Tabla 3: Protocolo del ensayo de inhibición de α -glucosidasa

Volúmenes (μ L)	CN	B	CP	CNE _{CP}	M	CNE _M
Tampón fosfato 100 mM	120	150	120	150	120	150
DMSO 11,5%	20	20	-----	-----	-----	-----
Extracto	-----	-----	-----	-----	20	20
Acarbosa	-----	-----	20	20	-----	-----
pNPG	60	60	60	60	60	60
Incubar por 5 minutos a 37 °C						
Solución enzimática 0,1 U/mL	30	-----	30	-----	30	-----
Medir a 400 nm, incubar por 30 minutos y volver a medir a 400 nm						

CN: control negativo, B: Blanco del control negativo, CP: control positivo, CNE_{CP}: control no enzimático del control positivo, M: muestra y CNE: control no enzimático la muestra. DMSO: Dimeltilsulfóxido, pNPG: p-nitrofenil- α -D-glucopiranosido

El esquema de los pocillos en la microplaca se planificó para facilitar el llenado de la misma (Figura 5).

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A												
B		CNE ₁	CNE ₁	CNE ₁	M ₁	M ₁	M ₁	B				
C		CNE ₂	CNE ₂	CNE ₂	M ₂	M ₂	M ₂	B				
D		CNE ₃	CNE ₃	CNE ₃	M ₃	M ₃	M ₃	B				
E		CNE ₄	CNE ₄	CNE ₄	M ₄	M ₄	M ₄	CN				
F		CNE ₅	CNE ₅	CNE ₅	M ₅	M ₅	M ₅	CN				
G		CNE ₆	CNE ₆	CNE ₆	M ₆	M ₆	M ₆	CN				
H												

Figura 5: Esquema de llenado de la microplaca para el ensayo de inhibición

Donde los números del 1-6 corresponden a las concentraciones decrecientes de los extractos o acarbosa siendo el 1 más concentrado y 6 menos concentrado. B: Blanco del control negativo. CN: control negativo, CNE: control no enzimático de la muestra y M: muestra.

Los porcentajes de inhibición (%) fueron calculados a partir de las absorbancias obtenidas mediante la siguiente ecuación:

$$\%I = \frac{(\Delta A_{CN} - \Delta A_B) - (\Delta A_M - \Delta A_{CNE})}{(\Delta A_{CN} - \Delta A_B)}$$

Dónde A corresponde a la absorbancia, Δ a la diferencia de las absorbancias entre el tiempo 0 min y 30 min ($A_{X(30 \text{ min})} - A_{X(0 \text{ min})}$), CN al control negativo, B al blanco, M a la muestra y CNE al control no enzimático.

Finalmente para el cálculo de las CI_{50} se graficaron los %I versus el logaritmo de la concentración (Log(C)) mediante el *software* GraphPad Prism® 6, versión 6,01 para Windows.

4.4.1.1. Preparación de soluciones

a. Solución de NaOH 1M

La solución de NaOH se preparó para llevar a pH 6,8 la solución tampón fosfato masando 400 mg de NaOH en un matraz de aforo de 10 mL que se enrasó con agua miliQ y fue almacenada a 4°C.

b. Solución tampón fosfato 100 mM

La solución tampón fosfato se preparó masando 345 mg de $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ en un vaso de precipitado de 50 mL al cual se le adicionó 20 mL de agua miliQ, posteriormente se sonicó en un *Ultrasonic Cleaner* VWR® hasta la completa disolución de los cristales. Finalmente se ajustó a pH 6,8 con una solución de NaOH 1M gota a gota con ayuda de un pH/mV/°C-metro (OAKTON® pH 500 serie), posteriormente se trasvasijó la solución ajustada a un matraz de aforo de 25 mL y se enrasó con agua miliQ. La solución se almacenó a 4°C por un máximo de 2 días, por lo cual fue necesaria la preparación de la solución para cada medición.

c. Solución enzimática 0,1 U/mL

La solución enzimática de α -glucosidasa de *S. cerevisiae* se preparó masando 2 mg de enzima (polvo blanco) en un matraz de aforo de 1 mL el cual fue enrazado con tampón fosfato (solución madre). Para almacenar la solución se dispuso en dos tubos eppendorf de 1,5 mL y se mantuvieron a -20°C . Al momento de realizar el ensayo se descongeló un eppendorf en hielo y se tomó una alícuota de $6,3\ \mu\text{L}$ con micropipeta y se dispuso en un tubo falcon de 15 mL. Finalmente se adicionaron $1993,7\ \mu\text{L}$ de tampón fosfato y se mantuvo a 4°C hasta la medición.

d. Solución de pNPG 5 mM

La solución sustrato se realizó masando 15 mg de pNPG en un matraz de aforo de 10 mL protegido de la luz y se enrasó con solución tampón fosfato. Se llevó al sonicador hasta completa disolución de los cristales y se trasvasijó a un tubo falcon de 15 mL protegido de la luz y se mantuvo a 4°C hasta el momento de la medición.

e. Solución de DMSO 11,5%

La solución de DMSO se preparó para no superar el 1% en el pocillo de reacción en la microplaca. Se tomaron 2,8 mL de DMSO puro en un matraz de aforo de 25 mL y se enrasó con agua miliQ. La solución se almacenó a 4°C hasta el momento de la medición.

f. Extractos y acarbosa

Para los extractos inicialmente se preparó una solución madre de $1,15\ \text{mg/mL}$ para que en el pocillo de reacción de la microplaca las concentraciones fueran del orden de los $\mu\text{g/mL}$. Se masaron 5,75 mg de los extractos en un matraz de aforo de 5 mL y se enrasó con solución de DMSO 11,5%, posteriormente se hicieron diluciones en tubos eppendorf donde se pipetearon los volúmenes

necesarios para las concentraciones a ensayar y se completó el volumen con DMSO 11,5%. Para el caso de los EAEs fue necesario preparar soluciones madres de mayor concentración debido a que estos fueron menos potentes a las mismas concentraciones de los EETs. Con esto las concentraciones finales de los EET fluctuaron entre 0,1 y 10 $\mu\text{g/mL}$ y las de los EAEs fluctuaron entre 5 y 300 $\mu\text{g/mL}$. La solución de acarbosa se preparó de la misma forma descrita previamente con concentraciones que fluctuaron entre 0,0026 y 13,0435 mg/mL .

4.4.2. Cinética de inhibición de α -glucosidasa

El ensayo se llevó a cabo en un espectrofotómetro de microplaca Thermo Scientific® Multiskan® GO, para lo cual se utilizó una placa de 96 pocillos, empleando la metodología descrita anteriormente con las modificaciones correspondientes. El medio de reacción consistió en un buffer fosfato 100 mM a pH 6,8 y pNPG a distintas concentraciones (5, 4, 3, 2, 1 y 0,5 mM). Los extractos a tres concentraciones distintas en DMSO 11,5% (concentraciones que bordearon el valor de la CI_{50}) fueron preincubados durante 5 min a 37°C con el medio de reacción, posteriormente se adicionó la solución enzimática 0,1 U/ml (α -glucosidasa de *S. cerevisiae*) para iniciar la reacción. Para el control se procedió de la misma forma pero en lugar de extractos se adicionó DMSO 11,5%. Para validar la metodología se procedió de igual manera con acarbosa como control positivo a distintas concentraciones en DMSO 11,5%. Inmediatamente después de iniciada la reacción se inició un ciclo cinético de 60 mediciones a 400 nm cada 30 segundos (30 minutos) a 37°C como lo indica el protocolo (Tabla 4).

El esquema de los pocillos en la microplaca se planificó para facilitar el llenado de la misma (Figura 6).

Con el fin de obtener el diagrama de Lineweaver-Burk o de dobles recíprocos para evaluar los cambios en las constantes cinéticas velocidad máxima (V_{max}) y constante de Michaelis-Menten (K_m), una vez obtenido las curvas de progresión de la reacción se procedió a: (i) calcular la velocidad inicial (V_o) que corresponde a la pendiente de la recta calculada utilizando el método de regresión lineal en la zona inicial o de velocidad rápida de la curva para cada concentración de sustrato en ausencia o presencia del inhibidor, (ii) una vez obtenidas las V_o , se graficaron en función de la concentración de sustrato, obteniéndose las respectivas curvas de Michaelis-Menten para visualizar estos cambios.

Tabla 4: Protocolo del ensayo de cinética de inhibición de α -glucosidasa

Volúmenes (μ L)	CN	B	CP	CNE _{CP}	M	CNE _M
Tampón fosfato 100 mM	120	150	120	150	120	150
DMSO 11,5%	20	20	-----	-----	-----	-----
Extracto	-----	-----	-----	-----	20	20
Acarbosa	-----	-----	20	20	-----	-----
pNPG	60	60	60	60	60	60
Incubar por 5 minutos a 37 °C						
Solución enzimática 0,1 U/mL	30	-----	30	-----	30	-----
Ciclo cinético de 60 mediciones a 400 nm cada 30 segundos a 37 °C						

CN: control negativo, B: Blanco del control negativo, CP: control positivo, CNE_{CP}: control no enzimático del control positivo, M: muestra y CNE: control no enzimático la muestra. DMSO: Dimeltisulfóxido, pNPG: p-nitrofenil- α -D-glucopiranosido

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A												
B		CNE ₁	CNE ₁	CNE ₁	M ₁	M ₁	M ₁					
C		CNE ₂	CNE ₂	CNE ₂	M ₂	M ₂	M ₂					
D		CNE ₃	CNE ₃	CNE ₃	M ₃	M ₃	M ₃					
E		CNE ₄	CNE ₄	CNE ₄	M ₄	M ₄	M ₄					
F		CNE ₅	CNE ₅	CNE ₅	M ₅	M ₅	M ₅					
G		CNE ₆	CNE ₆	CNE ₆	M ₆	M ₆	M ₆					
H												

Figura 6: Esquema de llenado de la microplaca para el ensayo de cinética de inhibición
 Donde los números del 1-6 corresponden a las concentraciones decrecientes del sustrato (pNPG) siendo el 1 más concentrado y 6 menos concentrado. CNE: control no enzimático, M: muestra

4.4.2.1. Preparación de soluciones

En general las soluciones utilizadas se prepararon de la misma forma que las soluciones del ensayo anterior, sin embargo el sustrato, los extractos y la acarbosa difieren.

a. Solución de pNPG

La solución sustrato se realizó masando 15 mg de pNPG en un matraz de aforo de 10 mL protegido de la luz y se enrasó con solución buffer fosfato. Se llevó al sonicador hasta completa disolución de los cristales y se trasvasió a un tubo falcon de 15 mL protegido de la luz. Posteriormente se realizaron diluciones en tubos eppendorf de 1,5 mL protegidos de la luz, tomando alícuotas con micropipeta y completando el volumen con solución tampón fosfato para obtener soluciones de 4, 3, 2, 1 y 0,5 mM, las cuales se mantuvieron a 4°C junto con la solución madre (5 mM) hasta el momento de la medición.

b. Extractos y acarbosa

Para los extractos se preparó una solución madre de 1,15 mg/mL. Se masaron 5,75 mg de los extractos en un matraz de aforo de 5 mL y se enrasó con solución de DMSO 11,5 %, posteriormente se hicieron diluciones en tubos eppendorf donde se pipetearon los volúmenes necesarios para las tres concentraciones a ensayar y se completó el volumen con DMSO 11,5 %. Las concentraciones finales bordearon el valor de las respectivas CI_{50} (una muy cercana a la CI_{50} , una un 100% por sobre la CI_{50} y una un 50% por debajo).

4.5. Análisis estadístico

Los resultados se presentaron como el promedio de tres determinaciones y la significancia de los resultados fue calculada mediante ANOVA de una vía y test de comparaciones múltiples de Tukey utilizando los *softwares* GraphPad Prism® 6 versión 6,1 para Windows o Microsoft® Excel® 2010 versión 14.0.7153.5000 (32 bits) para Windows.

5. Resultados y discusión

5.1. Estudios químicos

5.1.1. Rendimiento de los extractos

Los mejores rendimientos de los extractos (Tabla 5) fueron obtenidos con los EETs, seguido por los EAEs. Esto evidencia la alta presencia de compuestos polares como polifenoles de los EETs y la mediana presencia de compuestos menos polares como los terpenoides pentacíclicos de los EAEs arrastrados por los respectivos solventes en el material vegetal.

Tabla 5: Rendimiento de los extractos de hojas de murtila en la extracción seriada

Genotipos	EH (%)	EDCM (%)	EAE (%)	EET (%)
8-2 ^L	1,1	1,3	5,6	9,5
14-4 ^L	1,4	1,9	5,2	11,3
19-1 ^L	1,1	1,5	5,7	16,4
19-1ha ^L	1,1	3,0	4,5	14,8
ZF-18 ^L	1,1	1,7	3,1	27,7
19-2	1,3	1,9	5,2	10,2
22-1	1,1	1,6	7,0	13,0
23-2	1,1	1,3	4,8	12,1
27-1	1,1	1,7	5,1	12,5
31-1	1,5	1,7	3,1	8,5

EH: extracto de hexano, EDCM: extracto de diclorometano, EAE: extracto de acetato de etilo, EET: extracto etanólico, L: genotipo seleccionado por mayor cantidad de hojas

En los EAEs el genotipo que obtuvo mayor rendimiento corresponde al 22-1 con un porcentaje de rendimiento de un 7,0%, mientras que los que obtuvieron menor rendimiento en este caso corresponde a los genotipos ZF-18^L y 31-1 ambos con un valor de 3,1%. Con respecto a los EETs el genotipo con mayor rendimiento corresponde al ZF-18^L con un valor de 27,7% y el de menor rendimiento, nuevamente, al 31-1 con un valor de 8,5%.

Un estudio químico de los EETs realizado previamente en nuestro laboratorio, donde se midió el contenido fenólico total (CFT) mediante el ensayo de Folin-Ciocalteu, el ZF-18^L demostró ser el genotipo con mayor CFT lo que puede explicar el alto porcentaje de rendimiento obtenido (Valenzuela-Bustamante, 2015).

5.2. Estudios farmacológicos

5.2.1. Actividad Inhibitoria frente a α -glucosidasa

Los %I obtenidos para los EETs (Tabla 6) y los EAEs (Tabla 7) al compararse con Log(C) muestran diferencias importantes, además se puede notar la actividad inhibitoria concentración dependiente. Para éste estudio se consideraron como mínimo 5 puntos (%I) para el cálculo de la CI₅₀, mediante la curva concentración-respuesta de inhibición.

Tabla 6: Porcentajes de inhibición de los EETs frente a α -glucosidasa

Log(C)	%I \pm DE									
	8-2 ^L	14-4 ^L	19-1 ^L	19-1ha ^L	ZF-18 ^L	19-2	22-1	23-2	27-1	31-1
-1,0000	2,0 \pm 3,0		6,0 \pm 2,0							
-0,3979	5,0 \pm 6,0		13,0 \pm 1,0							
0,0000	20,0 \pm 10,0	3,0 \pm 5,0	31,0 \pm 2,0	15,0 \pm 3,0	7,0 \pm 6,0	30,0 \pm 4,0	28,0 \pm 2,0	48,0 \pm 2,0	24,0 \pm 13,0	35,0 \pm 13,0
0,3010	44,0 \pm 7,0	58,0 \pm 2,0	63,0 \pm 2,0	30,0 \pm 5,0	33,0 \pm 18,0	63,0 \pm 4,0	65,0 \pm 1,0	64,0 \pm 3,0	67,1 \pm 0,4	49,0 \pm 3,0
0,6021	60,0 \pm 3,0	77,0 \pm 1,0	81,0 \pm 1,0	60,0 \pm 1,0		74,4 \pm 0,1	80,0 \pm 4,0	85,5 \pm 0,3	77,0 \pm 4,0	76,0 \pm 3,0
0,7782	73,0 \pm 3,0	73,0 \pm 13,0		70,0 \pm 1,0	86,0 \pm 1,0	84,0 \pm 2,0	85,6 \pm 0,6	92,0 \pm 1,0	88,0 \pm 3,0	87,7 \pm 0,4
0,9031		85,9 \pm 0,5	80,5 \pm 0,7	81,0 \pm 1,0	91,9 \pm 0,2	88,6 \pm 0,2	89,8 \pm 0,5	95,2 \pm 0,4	91,7 \pm 0,9	90,0 \pm 1,0
1,0000		90,3 \pm 0,5		85,8 \pm 0,5	93,0 \pm 2,0	92,0 \pm 4,0	94,8 \pm 0,3			

EET: extracto etanólico, %I: porcentaje de inhibición, DE: desviación estándar, L: genotipo seleccionado por mayor cantidad de hojas

Junto a sus CI₅₀ el *software* GraphPad Prism® 6, entrega la curva %I vs Log(C), el Log(CI₅₀) y el parámetro *HillSlope* que corresponde a la pendiente de la sigmoidea, con lo cual se logra definir el %I en función del Log(C) (Anexo 2), que corresponde a la siguiente formula:

$$\%I = \frac{100}{1 + 10^{\text{HillSlope}(\text{Log}(CI_{50}) - \text{Log}(C))}}$$

Tabla 7: Porcentajes de inhibición de los EAEs frente a α -glucosidasa

Log (C)	%I \pm DE									
	8-2 ^L	14-4 ^L	19-1 ^L	19-1ha ^L	ZF-18 ^L	19-2	22-1	23-2	27-1	31-1
0,4771									14,0 \pm 2,0	
0,6990	8,0 \pm 1,0	5,0 \pm 1,0	0,0 \pm 0,0		12,3 \pm 0,2			14,0 \pm 1,0	27,0 \pm 2,0	0,8 \pm 0,8
0,9031									49,0 \pm 1,0	
1,0000	26,0 \pm 2,0	18,0 \pm 4,0	49,2 \pm 0,7	1,0 \pm 2,0	39,8 \pm 0,8		23,0 \pm 4,0	30,0 \pm 2,0	63,1 \pm 0,5	7,0 \pm 1,0
1,3010	54,9 \pm 0,8	56,0 \pm 10,0		19,0 \pm 1,0	65,0 \pm 0,6		18,0 \pm 7,0	60,7 \pm 0,8	80,9 \pm 0,4	30,5 \pm 0,8
1,6021	78,4 \pm 0,7	74,0 \pm 1,0	84,0 \pm 0,4	54,0 \pm 4,0	78,9 \pm 0,4		45,0 \pm 3,0	79,3 \pm 0,3	92,0 \pm 0,6	64,0 \pm 1,0
1,6990						5,0 \pm 1,0				
1,9031	88,7 \pm 0,9	86,0 \pm 2,0	91,9 \pm 0,5	76,2 \pm 0,6	87,4 \pm 0,4			87,9 \pm 0,2		82,0 \pm 1,0
2,0000	91,0 \pm 1,0	89,0 \pm 2,0	94,8 \pm 0,9	82,4 \pm 0,4	89,7 \pm 0,7	22,3 \pm 0,6	83,0 \pm 2,0	89,4 \pm 0,7		87,7 \pm 0,9
2,0792								91,3 \pm 0,8		
2,1761							30,0 \pm 2,0	90,0 \pm 2,0		
2,3010							42,0 \pm 4,0			
2,3979							60,0 \pm 6,0			
2,4771							67,0 \pm 1,0			

EAE: extracto de acetato de etilo, %I: porcentaje de inhibición, DE: desviación estándar, L: genotipo seleccionado por mayor cantidad de hojas

Las curvas de los extractos más y menos potentes frente a α -glucosidasa y de acarbosa (Figura 7) presentan curvas de comportamiento concentración-respuesta clásicos con notoria forma sigmoidea y similitud en los valores del eje de las abscisas (eje x) que representan los valores de Log(C), sin embargo las concentraciones utilizadas para definir la CI₅₀ de la acarbosa fueron 1000 veces mayores que la de los extractos (μ g/mL vs mg/mL).

Los valores de CI₅₀ obtenidos (Tabla 8) para cada extracto reflejan la potencia de un inhibidor frente a la enzima, en este caso, α -glucosidasa ya que indica la concentración a la cual se inhibe el 50% de la población de enzima, pese a que se comparan extractos con un compuesto puro (acarbosa como control positivo) esto nos da una idea de la potencia de los extractos versus el único inhibidor de α -glucosidasa disponible comercialmente en Chile.

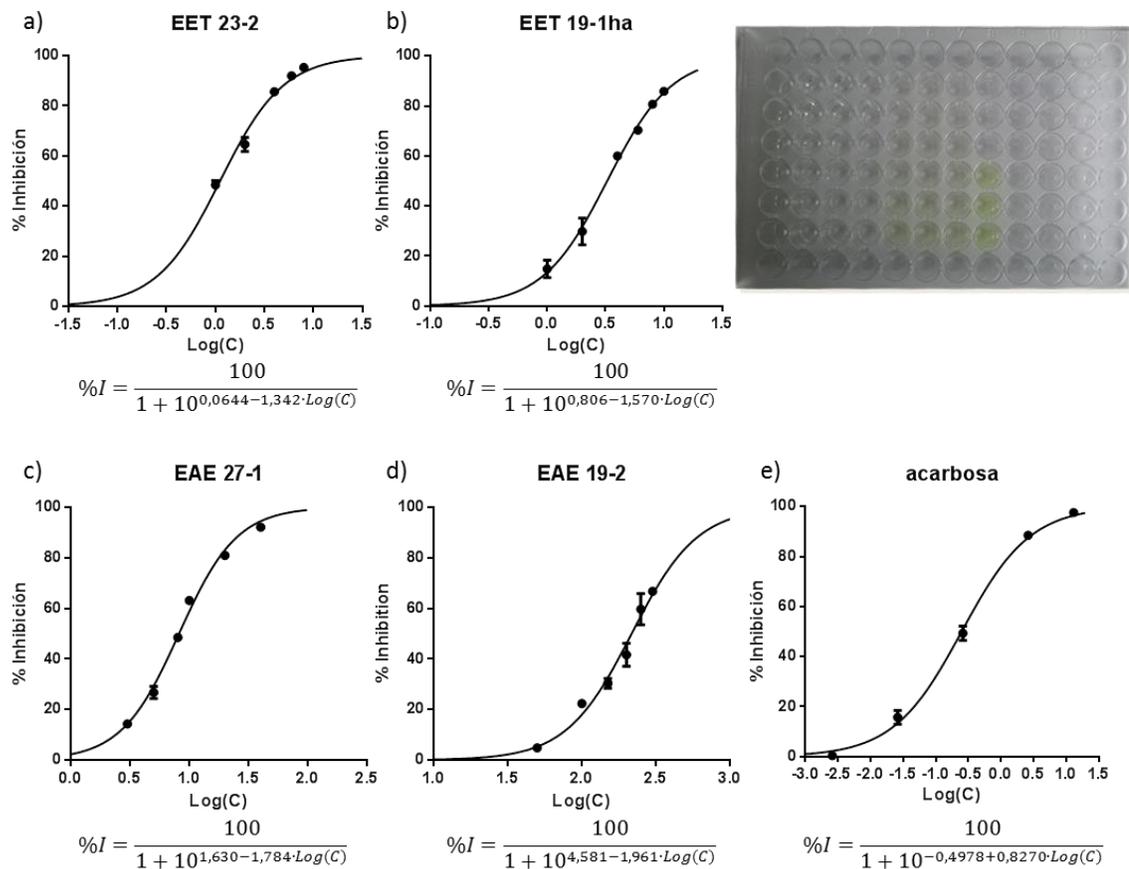


Figura 7: % Inhibición vs Log(C) de los EET, EAE y acarbosa

En orden decreciente de potencia, siendo el EET 23-2 el más potente y la acarbosa la menos potente

Los EETs mostraron mayor potencia que los EAEs. El EET 23-2 resultó ser el más potente con una CI_{50} de $1,12 \pm 0,07 \mu\text{g/mL}$, mientras que el menos potente corresponde al EET 19-1ha con una CI_{50} de $3,30 \pm 0,20 \mu\text{g/mL}$. Por otra parte el EAE 27-1 resultó ser el más potente de su grupo con una CI_{50} de $8,20 \pm 0,20 \mu\text{g/mL}$ y el EAE 19-2 el de menor potencia con una CI_{50} de $217,0 \pm 11,0 \mu\text{g/mL}$, sin embargo todos los extractos provenientes de los genotipos estudiados mostraron mayor potencia que acarbosa que obtuvo una CI_{50} de $251,0 \pm 34,0 \mu\text{g/mL}$.

Tabla 8: CI_{50} frente a α -glucosidasa de los EETs y EAEs de hojas de diez genotipos de murtilia

CI_{50} [μ g/mL] \pm DE		
Genotipos	EETs	EAEs
8-2^L	2,800 \pm 0,300 ^{*, a, c, d}	18,70 \pm 0,600 ^{*, a, e, g}
14-4^L	2,300 \pm 0,200 ^{*, a, d, e}	21,00 \pm 2,000 ^{*, a, d, g}
19-1^L	1,540 \pm 0,001 ^{*, b, e}	12,70 \pm 0,200 ^{*, b, e, f, g}
19-1ha^L	3,300 \pm 0,200 ^{*, a, c}	41,00 \pm 2,000 ^{*, c}
ZF-18^L	3,100 \pm 0,500 ^{*, a, c}	14,60 \pm 0,200 ^{*, a, b, e, g}
19-2	1,600 \pm 0,100 ^{*, b, d, e}	217,0 \pm 11,000 [*]
22-1	1,610 \pm 0,070 ^{*, b, d, e}	44,00 \pm 4,000 ^{*, c}
23-2	1,120 \pm 0,070 ^{*, b, e}	16,60 \pm 0,300 ^{*, a, b, d, e, g}
27-1	1,600 \pm 0,300 ^{*, b, d, e}	8,200 \pm 0,200 ^{*, b, f}
31-1	1,700 \pm 0,300 ^{*, b, d, e}	31,50 \pm 0,600 [*]
acarbosea	251,0 \pm 34,00	

* $p < 0,05$ diferencia significativa entre los CI_{50} de los extractos y el control positivo (acarbosea); la misma letra (a, b, c, d, e, f y g) en cada columna representan valores que no son estadísticamente diferentes ($p \geq 0,05$) por análisis de varianza (ANOVA) de una vía y test de comparaciones múltiples de Tukey. EAE: extracto de acetato de etilo, EET: extracto etanólico, L: genotipo seleccionado por mayor cantidad de hojas

Al analizar las CI_{50} frente a α -glucosidasa de los extractos de cada uno de los genotipos, se pudo determinar que los EETs de los genotipos seleccionados por la calidad de los frutos mostraron diferencias significativas ($p < 0,05$) respecto de los seleccionados por la cantidad de hojas mediante ANOVA de una vía, los genotipos seleccionados por la calidad de frutos fueron los más potentes con la excepción del genotipo 19-1^L. En cuanto a los EAEs no se observaron diferencias significativas ($p \geq 0,05$) entre los grupos de selección (Anexo 3).

Este resultado implica un factor relevante a la hora de seleccionar y recolectar material vegetal para futuros estudios. Una cualidad importante para el control de calidad son las características de los frutos que son comercializados y exportados, por lo tanto, este resultado da un valor agregado a la especie, específicamente a sus hojas, que en la actualidad son productos de desecho.

Por otra parte, las diferencias observadas en las CI_{50} de los extractos de cada genotipo pueden ser explicadas por las diferencias en la composición química tanto cualitativa como cuantitativa de los EETs así como de los EAEs. Como se mencionó previamente, los EETs se caracterizan por una mayor presencia de compuestos polares, principalmente compuestos fenólicos como flavonoides, ácidos fenólicos y taninos (investigación en desarrollo). Por otra parte los EAEs se caracterizan por una mayor presencia de compuestos con baja polaridad como los terpenoides, destacando los ácidos triterpénicos pentacíclicos.

Al revisar la literatura, podemos observar que estudios realizados con los compuestos aislados presentes en los EAEs y EETs de murtila, tanto los compuestos fenólicos como los terpenoides presentan CI_{50} menores a acarbosa (Tabla9).

Tabla 9: CI_{50} de los compuestos aislados presentes en los EAEs y EETs de hojas de murtila

	CI_{50}	Referencia		CI_{50}	Referencia
AA	$30,03 \pm 0,41 \mu\text{g/mL}$	Hou <i>et al.</i> , 2009	AU	$5,04 \pm 0,80 \mu\text{M}$ $12,47 \text{ nM}$	Wu <i>et al.</i> , 2014 Rani <i>et al.</i> , 2014
AB	Sin actividad	Rhaman <i>et al.</i> , 2008	Q	$58,9 \pm 6,69 \mu\text{M}$ $0,017 \text{ mmol/L}$ $8,86 \mu\text{g/mL}$ $5,30 \pm 0,11 \mu\text{mol/L}$	Islam <i>et al.</i> , 2013 Li <i>et al.</i> , 2009 Yin <i>et al.</i> , 2010 Yin <i>et al.</i> , 2010
AC	$3,53 \pm 0,27 \mu\text{g/mL}$	Hou <i>et al.</i> , 2009	AG	$24,3 \pm 2,37 \mu\text{M}$	Zhao <i>et al.</i> , 2009
AML	$5,52 \pm 0,19 \mu\text{g/mL}$	Hou <i>et al.</i> , 2009	Catequina	$190,7 \pm 2,08 \mu\text{M}$	Zhao <i>et al.</i> , 2009
			Epicatequina	$189,0 \pm 2,65 \mu\text{M}$	Zhao <i>et al.</i> , 2009
AO	$11,16 \mu\text{M}$ $88,72 \pm 1,02 \mu\text{g/mL}$	Sun <i>et al.</i> , 2006 Hou <i>et al.</i> , 2009	Procianidina		
			B3	$111,0 \pm 2,65 \mu\text{M}$	Zhao <i>et al.</i> , 2009
			B4	$89,0 \pm 2,65 \mu\text{M}$	Zhao <i>et al.</i> , 2009

Donde AA: ácido asiático, AB: ácido betulínico, AC: ácido corosólico, AML: ácido madecásico, AO: ácido oleanólico, AU: ácido ursólico, Q: quercetina y AG: ácido gálico.

Las diferencias estructurales de los metabolitos secundarios presentes en cada extracto afectan sus CI_{50} frente a la enzima α -glucosidasa. En general se ha observado que la hidroxilación de los anillos A y B de los flavonoides así como en el radical metilo del carbono 4 y el carbono 2 de los terpenoides, mejora la

actividad inhibitoria de α -glucosidasa. Por otra parte, la metilación de los hidroxilos, la glicosilación del hidroxilo en posición 3 de los flavonoides, así como la hidrogenación del doble enlace del anillo C, disminuyen la actividad (Sun *et al.*, 2006; Li *et al.*, 2009; Hou *et al.*, 2009; Yin *et al.*, 2014; Xiao *et al.*, 2013; Islam *et al.*, 2013; Wu *et al.*, 2014).

Con esto se podrían observar distintas interacciones como por ejemplo: A) sinergismo, donde la actividad de dos o más compuestos es mayor que la suma de las actividades farmacológicas de cada compuesto por separado, B) sumatoria o C) antagonismo, donde se produce una disminución del efecto de dos o más compuestos, lo que lleva a una disminución de la potencia del extracto.

Al comparar los valores de CI_{50} con los terpenoides cuantificados (Figura 8, a.1 y b.1) obtenidos en un estudio paralelo (Arancibia, 2015; Peña, 2015), en extractos de murtilla, sólo se observó correlación entre el ácido madecásico (AM) y las CI_{50} de los EAES mediante el análisis del coeficiente de correlación de Pearson (r) y el coeficiente de determinación (R^2), con un r igual 0,8187, lo que implica una correlación positiva fuerte y un R^2 igual a 0,6702 ($p < 0,05$), que explicaría que el 67% de la variación del CI_{50} se debe a los cambios en el contenido de AM (GraphPad Static Guide, 2015), lo que implica que al aumentar la concentración de AM en los extractos, también aumenta la CI_{50} , disminuyendo así la potencia. Por otra parte, los demás terpenoides no se correlacionaron ($p > 0,05$) con valores de r y R^2 cercanos a cero (Anexo 4). Por lo tanto la potencia de los extractos no se explicaría por la mayor presencia de uno u otro derivado triterpénico cuantificados. Por otro lado tampoco se observó correlación entre las CI_{50} y el contenido total de terpenoides ($p > 0,05$) cuantificados a la fecha (Figura 8, a.2 y b.2).

Con respecto a estudios previos realizado con los EETs (Valenzuela-Bustamante, 2015; Perez-Arancibia, 2015), al comparar las CI_{50} frente a la α -glucosidasa y el CFT, flavonas y flavonoles, flavanonas, quercetina y ácido gálico (Figura 9), no se observaron correlaciones positivas ($p > 0,05$) con valores de r y R^2 cercanos a cero (Anexo 5).

Cabe destacar que no hubo diferencia estadísticamente significativa entre las CI_{50} del EET más potente, 23-2, con los EETs 14-4^L, 19-1^L, 19-2, 22-1, 27-1 y 31-1, ni del EAE más potente, 27-1, con el EAE 19-1^L, por ANOVA y test de comparación múltiple de Tukey. Con esto se confirma que entre los EETs existe un 30% de diferencia entre los genotipos y entre los EAE un 80% respecto al más potente.

Por lo tanto, en una mirada global, los genotipos que se repiten en ambos extractos podrían corresponder a los genotipos con mayor actividad inhibitoria (genotipos 19-1^L y 27-1), es decir los más potentes.

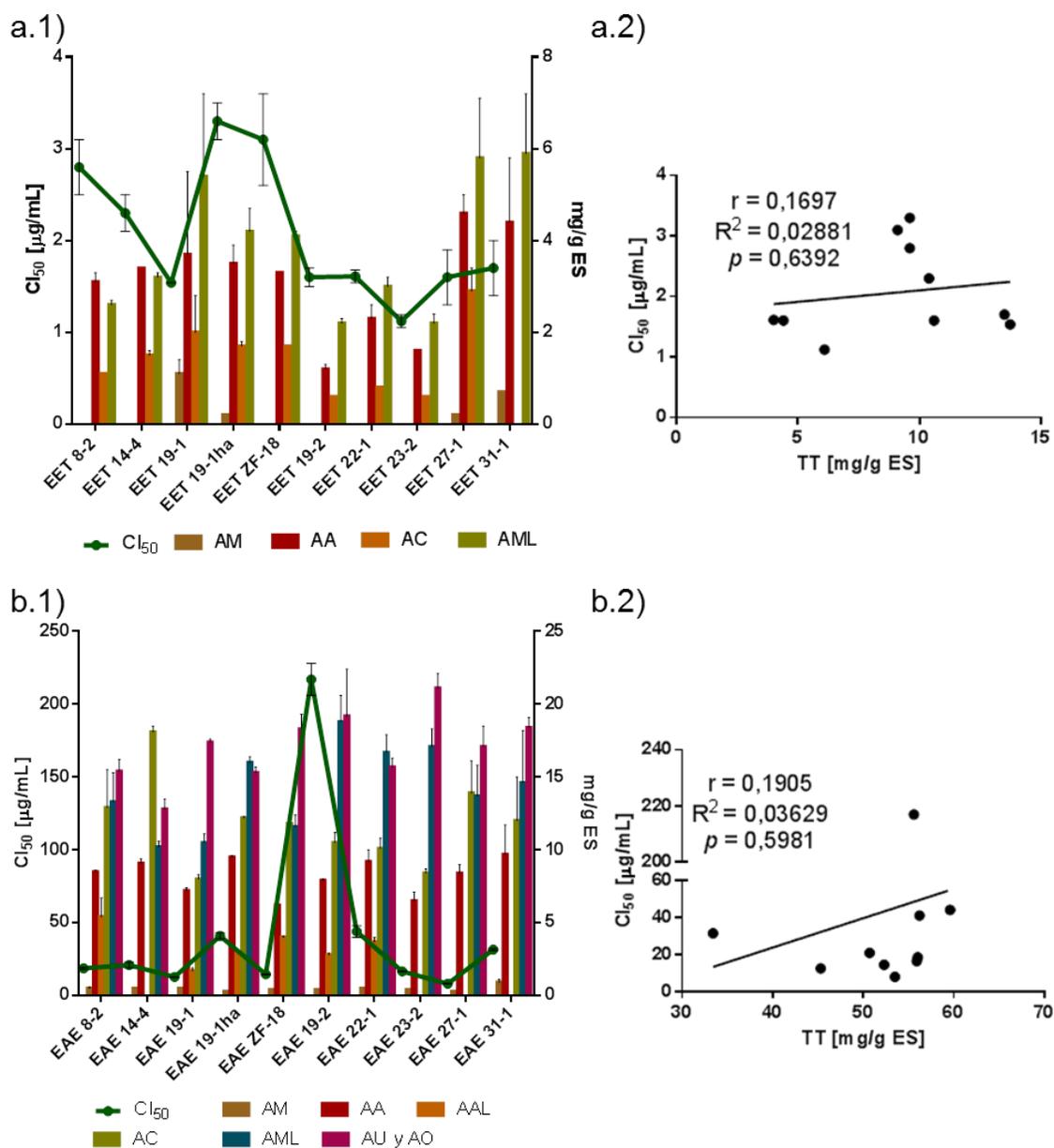


Figura 8: Comparación y correlación entre las CI₅₀ frente a la α -glucosidasa y terpenoides presentes en los EETs y EAEs de hojas de murtilla

CI₅₀: Concentración inhibitoria 50%, AM: ácido madecásico, AA: ácido asiático, AAL: ácido alfitólico, AC: ácido corosólico, AML: ácido maslínico, AU: ácido ursólico, AO: ácido oleanólico y TT: terpenoides totales (suma de los terpenoides cuantificados). ES: extracto seco, EAE: extracto de acetato de etilo, EET: extracto etanólico.

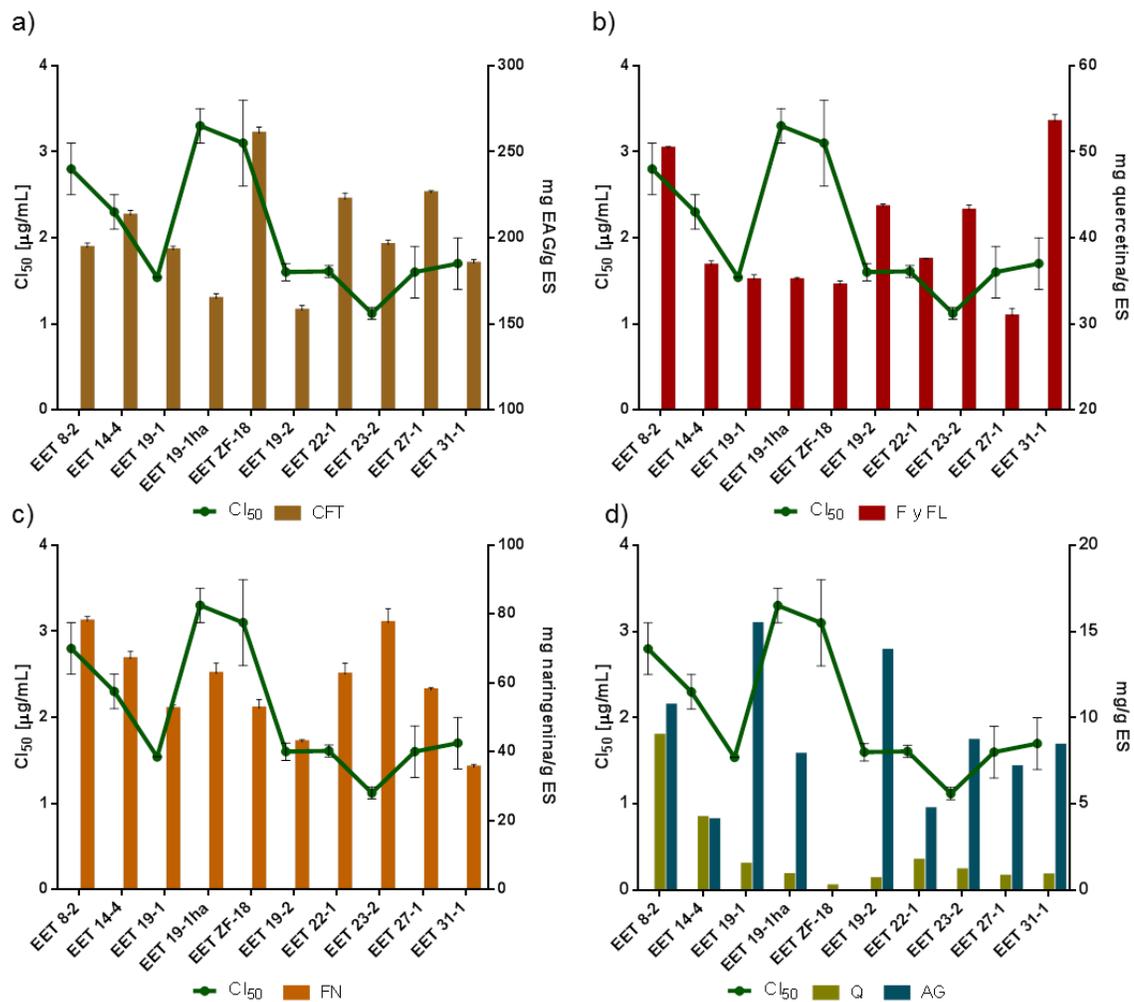


Figura 9: Comparación de las Cl_{50} frente a la α -glucosidasa y CFT, contenido de flavonoides y ácido gálico de los EETs

a) Comparación entre Cl_{50} y contenido de fenoles totales (CFT), expresados en ácido gálico por el método de Folin-Ciocalteu, b) Comparación entre Cl_{50} y contenido de flavonoides totales expresados en quercetina por el método de AlCl_3 , c) Contenido total de flavanonas (FN) expresadas en naringenina por el método de nitrofenilhidrazina; d) Comparación entre la Cl_{50} y el contenido de quercetina (Q) y ácido gálico (AG) medidos con CLAE-DAD. Cl_{50} : concentración inhibitoria 50%, F: flavonas y FL: flavonoles. EAE: extracto de acetato de etilo, EET: extracto etanólico

5.2.2. Comparación con ensayos de actividad antioxidante

5.2.2.1. Actividad inhibitoria de α -glucosidasa y efectividad antioxidante

En estudios previos realizados con los EETs, se determinó la efectividad antioxidante (EA) mediante el ensayo de apagamiento del radical DPPH (2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl). La EA es un parámetro que considera tanto la potencia del extracto, EC_{50} (concentración necesaria para disminuir en un 50% la cantidad de DPPH) por la habilidad de donar un electrón o un protón, como la velocidad de reacción, TEC_{50} , tiempo en el cual el antioxidante a la CE_{50} estabiliza la cantidad de DPPH (Pérez-Arancibia, 2015). Al comparar estas dos actividades (Figura 10) se observa que el EET 14-4^L resulta ser el extracto con mayor EA y con una buena potencia inhibitoria frente a α -glucosidasa.

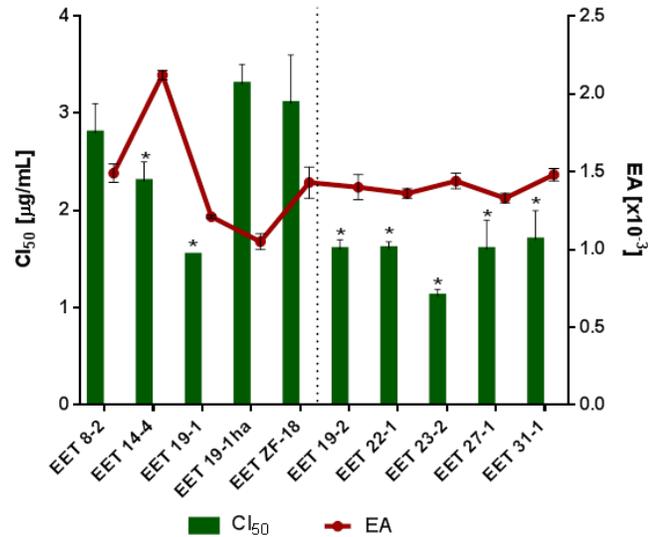


Figura 10: Comparación de las CI_{50} y Efectividad Antioxidante de los EETs de murtila

CI_{50} : concentración inhibitoria 50%, EA: efectividad antioxidante, EET: extracto etanólico. * Corresponde a los genotipos con CI_{50} sin diferencia estadísticamente significativa ($p \geq 0,05$). La línea punteada divide la gráfica entre los genotipos elegidos por la cantidad de hojas (izquierda) de los elegidos por la calidad de sus frutos (derecha).

5.2.2.2. Actividad inhibitoria de α -glucosidasa y poder antioxidante reductor del hierro

El estudio FRAP (de su nombre en inglés *ferric reduction antioxidant power*), es un ensayo que mide la capacidad de un antioxidante para reducir el ion férrico (Fe^{+3}) del complejo férrico-2,4,6-tripiridil-s-triazina (TPTZ) a ion ferroso (Fe^{+2}) a pH bajo. Un estudio previo realizado a los EETs con el método FRAP observo el mayor valor FRAP a los 60 minutos por parte del EET ZF-18^L ($5,40 \pm 0,12$ mmol Fe^{+2} /g de extracto seco), que no obtuvo diferencia significativa con los EET 14-4^L, 22-1 y 27-1 (Valenzuela-Bustamante, 2015). Al comparar con los resultados obtenidos en este estudio, nuevamente destacan los genotipos 14-4^L y 27-1 (Figura 11).

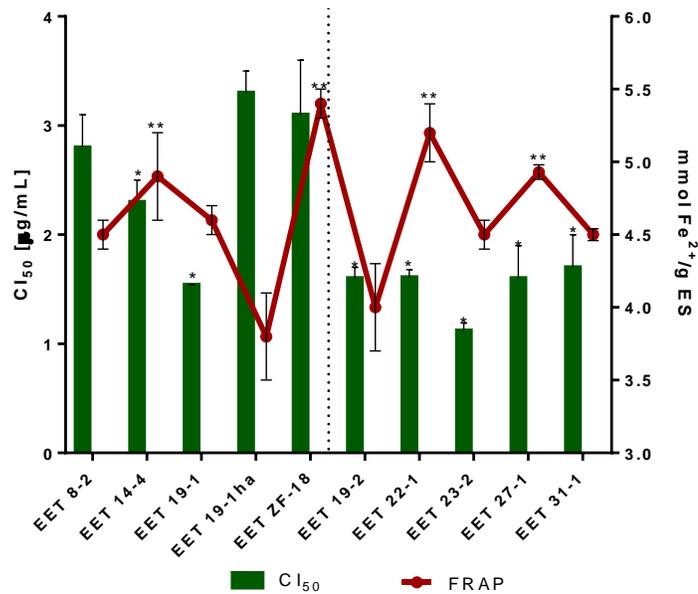


Figura 11: Comparación de las CI₅₀ y FRAP de los EETs

CI₅₀: concentración inhibitoria 50%, FRAP: *ferric reduction antioxidant power*, EET: extracto etanólico. * Corresponde a los EETs con CI₅₀ sin diferencia estadísticamente significativa ($p \geq 0,05$). ** corresponde a los EETs con valor FRAP sin diferencia estadísticamente significativa ($p \geq 0,05$). La línea punteada divide la gráfica entre los genotipos elegidos por la cantidad de hojas (izquierda) de los elegidos por la calidad de sus frutos (derecha).

5.2.2.3. Actividad inhibitoria de α -glucosidasa y capacidad de absorción de radicales de oxígeno

Un estudio paralelo realizado a los extractos a través del método ORAC-FI (de su nombre en inglés *oxygen radicals antioxidant capacity-fluorescein*), que evalúa la capacidad que posee una muestra antioxidante para proteger a una molécula sonda (fluoresceína) del ataque de un radical libre (como el radical peroxilo o el radical hidroxilo) generado *in situ*, a través de la estabilización de dicho radical mediante la cesión de un átomo de hidrógeno. El estudio observó mayores índices ORAC por parte de los EET siendo el EET 19-1^L el de mayor valor, seguido por los EET 19-2, 22-1 y 14-4^L (Peña-Cerda, 2015). Al comparar estos resultados con los obtenidos en el presente estudio (Figura 12), nuevamente resalta el genotipo 14-4^L seguido del 19-1^L.

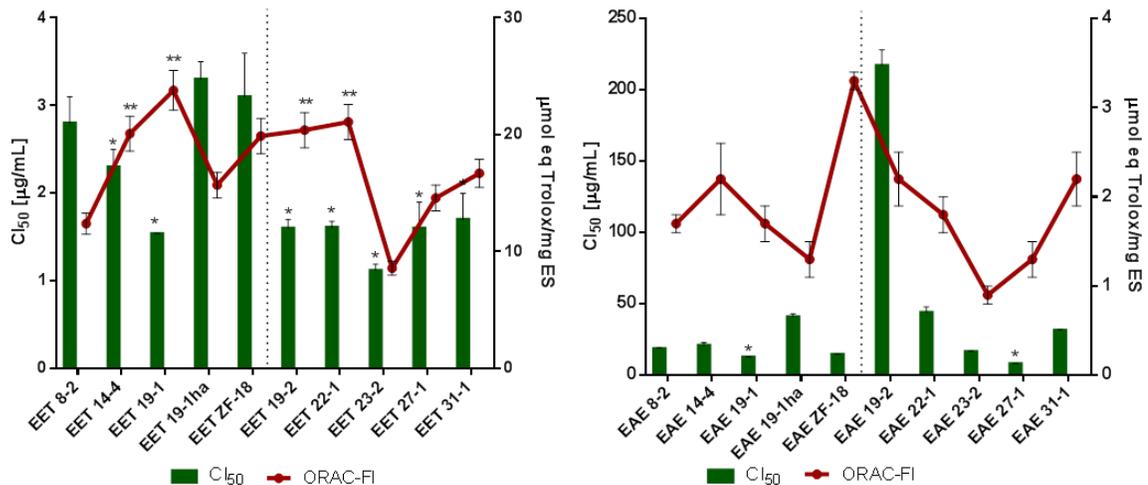


Figura 12: Comparación de las Cl₅₀ y ORAC-FI de los EAes y EETs

Cl₅₀: concentración inhibitoria 50%, ORAC-FI: *oxygen radical antioxidant capacity – Fluorescein*, EAE: extracto de acetato de etilo, EET: extracto etanólico y ES: extracto seco. * Corresponde a los extractos con Cl₅₀ sin diferencia estadísticamente significativa ($p \geq 0,05$). ** Corresponde a los EAes con mayor valor ORAC obtenidos con este método. La línea punteada divide la gráfica entre los genotipos elegidos por la cantidad de hojas (izquierda) de los elegidos por la calidad de sus frutos (derecha).

El genotipo 14-4^L exhibe una potencia media con respecto a los demás genotipos, pero alta respecto a acarbosa en el ensayo de inhibición de α -glucosidasa. Por lo tanto es un buen candidato en futuros estudios dada su actividad antioxidante (por los mecanismos previamente descritos) y de inhibición.

5.2.3. Comparación con otros ensayos enzimáticos

5.2.3.1. Actividad inhibitoria de α -glucosidasa y de la glicógeno fosforilasa a

En la búsqueda de más blancos farmacológicos relacionados a la DMT2, un estudio previo evaluó la capacidad de los extractos para inhibir la enzima glicógeno fosforilasa a, que participa en la liberación de glucosa a partir del glicógeno almacenado. Esta enzima se encuentra tanto a nivel hepático, muscular y cerebral (Bugueño, 2015). Al comparar las CI_{50} obtenidas en ambos estudios resaltan los genotipos 19-1^L, 23-2 y 31-1 que obtuvieron los mejores resultados tanto de los EETs como EAEs (Figura 13).

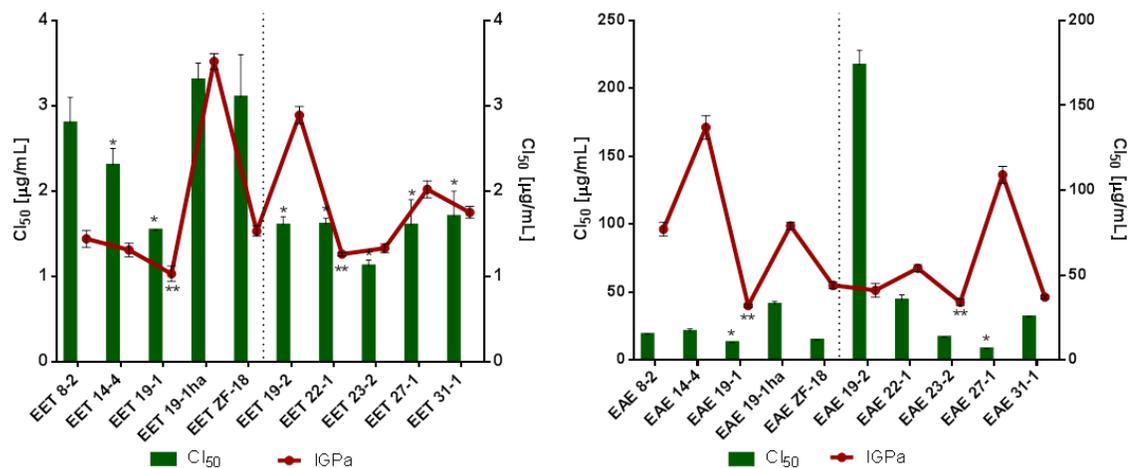


Figura 13: Comparación de las CI_{50} y GPa de los EAAs y EETs

CI_{50} : concentración inhibitoria 50%, IGPa: inhibición de glicógeno fosforilasa a. * Corresponde a los extractos con CI_{50} sin diferencia estadísticamente significativa ($p \geq 0,05$). ** corresponde a los extractos con CI_{50} sin diferencia estadísticamente significativa ($p \geq 0,05$) en el ensayo de IGPa. La línea punteada

divide la gráfica entre los genotipos elegidos por la cantidad de hojas (izquierda) de los elegidos por la calidad de sus frutos (derecha).

5.2.3.2. Actividad inhibitoria de α -glucosidasa y de la proteína tirosina fosfatasa 1B

La proteína tirosina fosfatasa 1B (PTP1B) se relaciona con el receptor de insulina y los sustratos del receptor de insulina, a los cuales puede desfosforilar desacoplando al receptor por un lado y cortando la via de señalización de este receptor, por otro. Estudios preliminares de los extractos mostraron un mayor % de la PTP1B por parte del EAE 19-1^L, sin diferencias estadísticamente significativos con los EAE 19-2 y 27-1 y el EET 23-2, sin diferencias significativas con el EET ZF-18^L y 22-1. Al comparar estos resultados preliminares con lo obtenidos en este estudio, nuevamente sobresalen los genotipos 19-1^L, 27-1 y 23-2 (Figura 14).

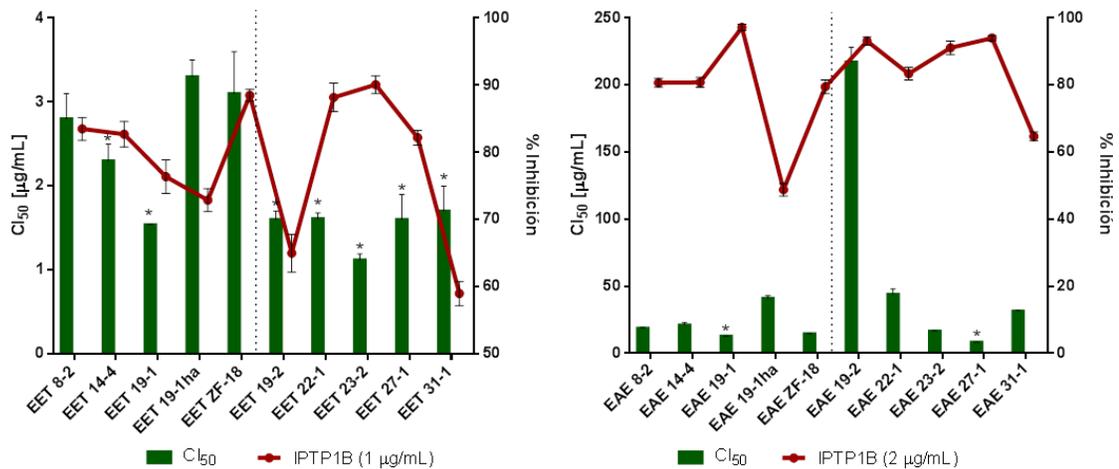


Figura 14: Comparación de las CI₅₀ y %Inhibición de PTP1B de los EAEs y EETs

CI₅₀: concentración inhibitoria 50%, IPTP1B: inhibición de la proteína tirosina fosfatasa 1B. * Corresponde a los extractos con CI₅₀ sin diferencia estadísticamente significativa ($p \geq 0,05$). La línea punteada divide la gráfica entre los genotipos elegidos por la cantidad de hojas (izquierda) de los elegidos por la calidad de sus frutos (derecha).

El genotipo 19-1^L resalta por sus actividades inhibitorias de las enzimas relacionadas a la DMT2.

5.3. Cinética de inhibición de α -glucosidasa

Una vez obtenidas las curvas de progresión de las reacciones (Anexo 6), se calcularon las pendientes de la recta que corresponden a las V_0 de la etapa inicial o de velocidad rápida (Tabla 10). Posteriormente se graficaron en función de las concentraciones de sustrato utilizadas, para observar cambios en la cinética enzimática obteniéndose así las respectivas curvas de Michaelis-Menten (Figura 15).

Tabla 10: Velocidades iniciales de los extractos más potentes y control

V ₀ [UA/min] ± DE				
S [mM]	Control Negativo	acarbosa 75 μ g/mL	acarbosa 150 μ g/mL	acarbosa 300 μ g/mL
0,5	0,0098 ± 0,0006	0,0052 ± 0,0002	0,0036 ± 0,0001	0,0021 ± 0,0002
1	0,0150 ± 0,0006	0,0088 ± 0,0001	0,0060 ± 0,0002	0,0035 ± 0,0002
2	0,0210 ± 0,0004	0,0139 ± 0,0003	0,0102 ± 0,0005	0,0067 ± 0,0001
3	0,0254 ± 0,0007	0,0177 ± 0,0005	0,0139 ± 0,0003	0,0092 ± 0,0003
4	0,0273 ± 0,0005	0,0273 ± 0,0005	0,0165 ± 0,0009	0,0117 ± 0,0006
5	0,0302 ± 0,0004	0,0302 ± 0,0004	0,0202 ± 0,0002	0,0149 ± 0,0006
S [mM]	EET 23-2 0,75 μ g/mL	EET 23-2 1,125 μ g/mL	EET 23-2 1,5 μ g/mL	EET 27-1 0,75 μ g/mL
0,5	0,0081 ± 0,0006	0,0079 ± 0,0009	0,0083 ± 0,0005	0,0080 ± 0,0002
1	0,0117 ± 0,0006	0,0098 ± 0,0008	0,0105 ± 0,0004	0,0113 ± 0,0001
2	0,0155 ± 0,0006	0,0136 ± 0,0008	0,0144 ± 0,0005	0,0151 ± 0,0007
3	0,0180 ± 0,0010	0,0154 ± 0,0009	0,0163 ± 0,0003	0,0173 ± 0,0005
4	0,0200 ± 0,0010	0,0180 ± 0,0010	0,0178 ± 0,0002	0,0186 ± 0,0004
5	0,0225 ± 0,0008	0,0190 ± 0,0010	0,0212 ± 0,0009	0,0224 ± 0,0004
S [mM]	EET 27-1 1,5 μ g/mL	EET 27-1 3,0 μ g/mL	EAE 23-2 7,5 μ g/mL	EAE 23-2 15,0 μ g/mL
0,5	0,0065 ± 0,0003	0,0058 ± 0,0005	0,0103 ± 0,0004	0,0091 ± 0,0006
1	0,0092 ± 0,0006	0,0080 ± 0,0010	0,0145 ± 0,0002	0,0132 ± 0,0007
2	0,0126 ± 0,0004	0,0123 ± 0,0006	0,0197 ± 0,0001	0,0182 ± 0,0009
3	0,0143 ± 0,0009	0,0134 ± 0,0005	0,0214 ± 0,0009	0,0210 ± 0,0010
4	0,0153 ± 0,0006	0,0146 ± 0,0004	0,0230 ± 0,0020	0,0219 ± 0,0006
5	0,0180 ± 0,0010	0,0153 ± 0,0004	0,0254 ± 0,0005	0,0240 ± 0,0010
S [mM]	EAE 23-2 30,0 μ g/mL	EAE 27-1 3,75 μ g/mL	EAE 27-1 7,5 μ g/mL	EAE 27-1 15,0 μ g/mL
0,5	0,0105 ± 0,0004	0,0092 ± 0,0004	0,0069 ± 0,0004	0,0068 ± 0,0005
1	0,0140 ± 0,0020	0,0132 ± 0,0003	0,0113 ± 0,0008	0,0086 ± 0,0005
2	0,0200 ± 0,0010	0,0171 ± 0,0003	0,0129 ± 0,0008	0,0140 ± 0,0007
3	0,0210 ± 0,0004	0,0194 ± 0,0007	0,0168 ± 0,0007	0,0148 ± 0,0006
4	0,0233 ± 0,0002	0,0208 ± 0,0002	0,0180 ± 0,0010	0,0172 ± 0,0002
5	0,0253 ± 0,0006	0,0236 ± 0,0001	0,0200 ± 0,0010	0,0194 ± 0,0007

S: Sustrato, V₀: velocidad inicial, EAE: extracto de acetato de etilo, EET: extracto etanólico

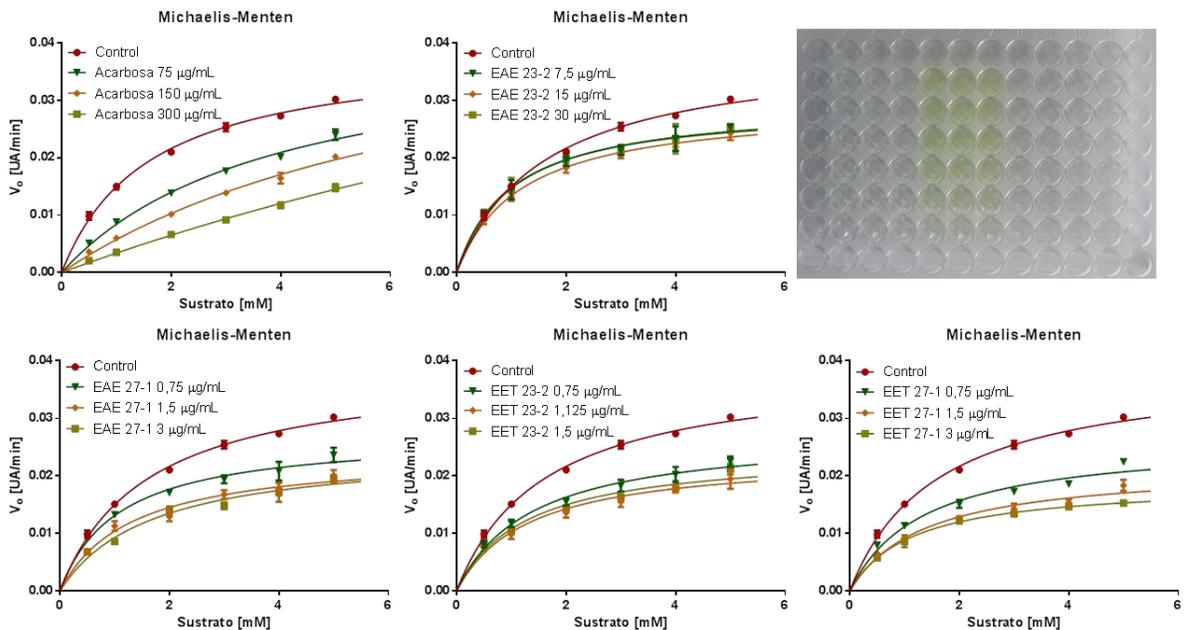


Figura 15: Cinética de Michaelis-Menten de los extractos más potentes y acarbosa

UA: unidades de absorbancia, V_0 : velocidad inicial, S: sustrato, EAE: extracto de acetato de etilo, EET: extracto etanólico

Para evidenciar los cambios en las constantes cinéticas se graficaron sus recíprocos, de esta forma se obtuvieron las gráficas de Lineweaver-Burk (Figura 16), con las cuales es posible determinar el valor exacto de las constantes y sus cambios aparentes y definir el mecanismo de inhibición de α -glucosidasa. Las constantes cinéticas en presencia de un inhibidor se denominan: constante de Michaelis-Menten aparente (K_m^*) y velocidad máxima aparente (V_{max}^*).

Para validar la metodología se obtuvieron las constantes cinéticas con el inhibidor acarbosa, compuesto puro, dado que se conoce el mecanismo de inhibición que corresponde al de un inhibidor competitivo. Esto quiere decir que la acarbosa compite con el sustrato por el sitio activo o catalítico de la enzima (Marangoni, 2003).

Según los resultados obtenidos (Tabla 11), el control negativo (ausencia de inhibidor) posee una K_m de $1,4 \pm 0,2 \mu\text{g/mL}$ y una V_{max} de $0,037 \pm 0,002 \text{ UA/min}$. En presencia de acarbosa la K_m^* aumenta mientras que la V_{max}^* no se ve afectada, esto se observa en la gráfica de dobles recíprocos como la intercepción de todas las rectas en el mismo punto, sobre el eje Y ($1/V_{\text{max}}$), mientras que en el eje X las intercepciones ($-1/K_m$) se alejan del origen. Este esquema es característico de los inhibidores competitivos que como se mencionó previamente compiten con el sustrato por el sitio activo (Figura 17.a), lo que valida la metodología empleada.

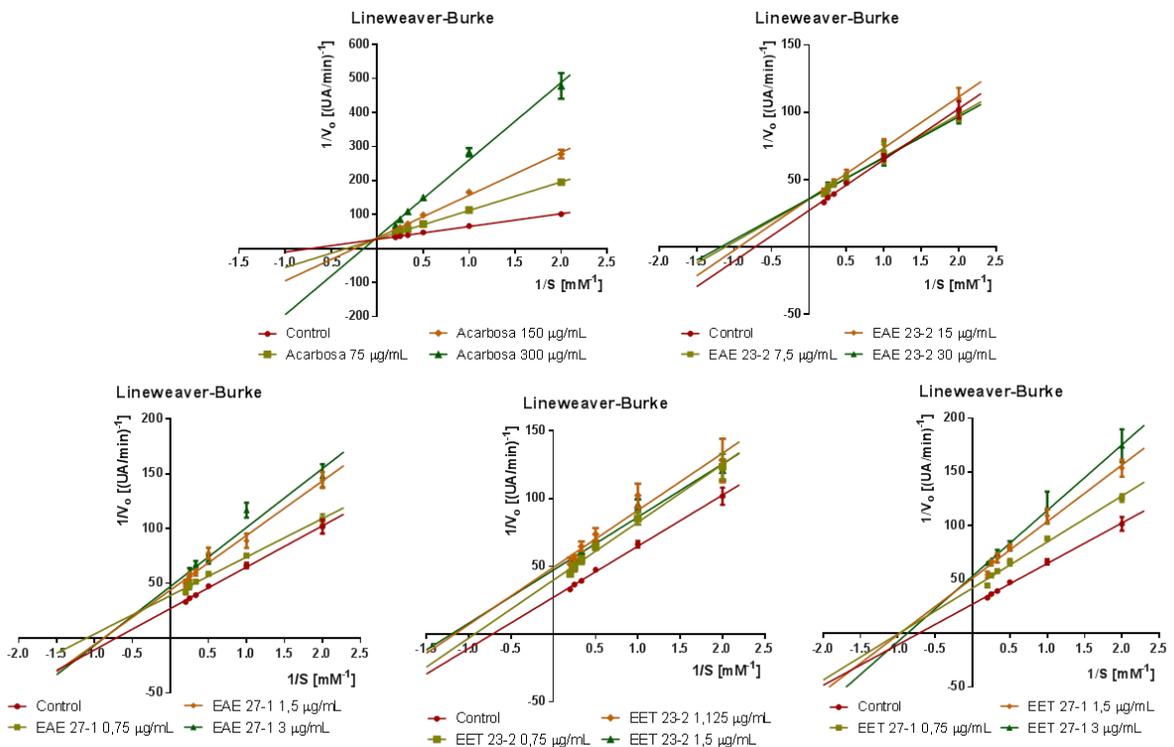


Figura 16: Gráfica de Lineweaver-Burk de los extractos más potentes y acarbosa

UA: unidades de absorbancia, V_0 : velocidad inicial, S: sustrato, EAE: extracto de acetato de etilo, EET: extracto etanólico

Tabla 11: Cambios en los valores de las constantes cinéticas

Constante	Muestra				Mecanismo
	control	acarbosa			
		75 µg/mL	150 µg/mL	300 µg/mL	
$V_{max}^{(*)}$ [UA/min]	0,037 ± 0,002	0,036 ± 0,002	0,032 ± 0,001	0,029 ± 0,005	Inhibición competitiva
$K_m^{(*)}$ [mM]	1,4 ± 0,2	3,0 ± 0,2	4,0 ± 0,2	6,6 ± 1,5	
	control	EET 23-2			
		0,75 µg/mL	1,125 µg/mL	1,5 µg/mL	
$V_{max}^{(*)}$ [UA/min]	0,037 ± 0,002	0,025 ± 0,005	0,020 ± 0,002	0,019 ± 0,002	Inhibición acompetitiva
$K_m^{(*)}$ [mM]	1,4 ± 0,2	1,1 ± 0,2	0,9 ± 0,2	0,8 ± 0,1	
	control	EAE 23-2			
		7,5 µg/mL	15 µg/mL	30 µg/mL	
$V_{max}^{(*)}$ [UA/min]	0,037 ± 0,002	0,028 ± 0,000	0,028 ± 0,003	0,023 ± 0,001	Inhibición acompetitiva
$K_m^{(*)}$ [mM]	1,4 ± 0,2	0,89 ± 0,07	1,1 ± 0,2	0,85 ± 0,05	
	control	EET 27-1			
		0,75 µg/mL	1,5 µg/mL	3 µg/mL	
$V_{max}^{(*)}$ [UA/min]	0,037 ± 0,005	0,023 ± 0,001	0,020 ± 0,001	0,019 ± 0,002	Inhibición no competitiva mixta
$K_m^{(*)}$ [mM]	1,4 ± 0,2	1,02 ± 0,06	0,98 ± 0,05	1,15 ± 0,19	
	control	EAE 27-1			
		3,75 µg/mL	7,5 µg/mL	15 µg/mL	
$V_{max}^{(*)}$ [UA/min]	0,037 ± 0,006	0,026 ± 0,002	0,023 ± 0,002	0,021 ± 0,001	Inhibición no competitiva mixta
$K_m^{(*)}$ [mM]	1,4 ± 0,2	0,91 ± 0,13	1,14 ± 0,17	1,14 ± 0,05	

$V_{max}^{(*)}$: velocidad máxima (aparente), $K_m^{(*)}$: constante de Michaelis-Menten (aparente), EAE: extracto de acetato de etilo y EET extracto etanólico

Por otra parte, el genotipo 23-2 tanto en su EAE como EET evidencia una disminución tanto de la K_m^* como de la V_{max}^* , observando líneas paralelas o con intercepción en el primer cuadrante en las gráficas de dobles recíprocos. Este comportamiento es característico de los inhibidores acompetitivos, que se unen a la enzima solo cuando esta ya se ha unido al sustrato (Figura 17.b).

Finalmente, el genotipo 27-1 tanto en su EAE como en su EET evidencia una disminución de la K_m^* como de la V_{max}^* , con líneas que tienden a interceptarse en el segundo o tercer cuadrante de la gráfica, comportamiento característico de inhibidores no competitivos mixtos (o parciales), que se unen tanto a la enzima libre como a la que ya se ha unido al sustrato (Figura 17.c). Si la intercepción de las rectas se presentara en el eje X, estaríamos en la presencia de un inhibidor no competitivo o no competitivo puro (Copeland, 2000; Marangoni, 2003).

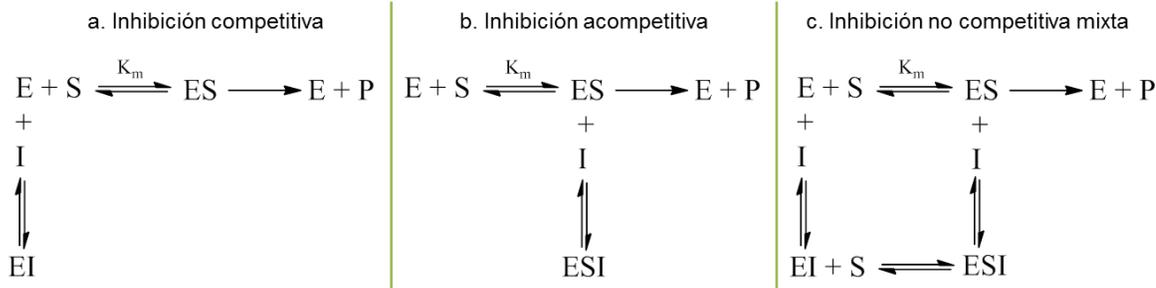


Figura 17: Diagramas de interacción enzima-sustrato-inhibidor según tipo de inhibición

E: Enzima, S: Sustrato, I: Inhibidor y K_m : Constante de Michaelis-Menten

Estudios *in silico* demuestran que algunos compuestos presentes también en los extractos de murtila tienen buenas energías de unión a α -glucosidasa como el caso de los compuestos fenólicos, destacando la quercetina y la miricetina (Hyun *et al.* 2014).

Por otra parte se ha determinado el mecanismo de inhibición de los compuestos aislados como el ácido corosólico que tiene un comportamiento de inhibidor acompetitivo frente a α -glucosidasa (Hou *et al.*, 2009)

Como se mencionó previamente, se están comparando extractos con un compuesto puro, acarbosa, utilizado como control positivo y validador del método. Sin embargo, los extractos, mezcla compleja de distintos compuestos, presentan cambios características en sus constantes cinéticas que los clasifican como algún tipo de inhibidor. Como se mencionó antes, las diferencias estructurales permiten interacciones en distintos sitios de la enzima que modulan su actividad, ya sea en su sitio activo o en algún sitio alostérico. Al clasificarse los extractos como inhibidores acompetitivos y no competitivos mixtos, se entiende que estos compuestos interactúan en algún sitio alostérico.

Al aumentar las concentraciones de extracto, aumentan las concentraciones de compuestos con actividad inhibitoria, pudiendo saturar los sitios de unión. Esto podría explicar cambios en el comportamiento de los extractos al aumentar sus concentraciones, que se ven reflejados en las rectas de la gráfica de dobles recíprocos, observándose patrones no tan claros como si fuesen compuestos puros, como en el caso de la acarbosa.

6. Conclusiones

Se acepta la hipótesis, dado que se observan diferencias significativas en las CI_{50} de los EAEs y EETs de los diez genotipos.

Los EETs de los genotipos escogidos por la calidad de frutos son más potentes que los escogidos por la cantidad de hojas.

Existen diferencias en el tipo de inhibición donde por un lado el genotipo 23-2 actúa como un inhibidor acompetitivo y por otro el 27-1 como uno no competitivo mixto.

Las diferencias en las potencias de inhibición de la α -glucosidasa se relacionan directamente con el factor genético de los individuos, puesto que éstos fueron cultivados en las mismas condiciones edafoclimáticas y el mismo manejo agronómico.

Los genotipos 14-4^L, 19-1^L, 23-2 y 27-1 poseen buenas proyecciones *in vivo* para el tratamiento de la DMT2 debido a su actividades antioxidantes e inhibitoras de enzimas relacionadas a esta enfermedad *in vitro*.

7. Referencias

AGUIRRE M., Delporte C., Backouse N, Erazo S., Letelier M., Cassels B., Silva X., Alegría S., Negrete R. 2006. Topical anti-inflammatory activity of 2 α -hydroxy pentacyclic triterpene acids from the leaves of *Ugni molinae*. Bioorganic and Medicinal Chemistry 14:5673-5677.

AL-DALLEN S., Chavez T., Martinez G., Ferreira E., León O. 2004 El Equilibrio Redox en la Diabetes y sus Complicaciones. Acta Farmacéutica Bonaerense 23(2):231-242.

ALEJANDRO M., Jaramillo X., Ojeda S., Malagón O., Ramírez J. 2013. Actividad antioxidante y antihiper glucemiante de la especie medicinal *Oreocallis grandiflora* (Lam.) R. Br., al sur del Ecuador. Boletín Latinoamericano y del Caribe de Plantas Medicinales y Aromáticas 12 (1):59-68.

ARANCIBIA J. 2015. Influencia del genotipo en las propiedades antiinflamatorias, hipoglicemiantes y perfil de triterpenoides de las hojas de *Ugni molinae*. Primer avance de tesis para optar al grado de Doctor en Ciencias Farmacéuticas, Universidad de Chile, Facultad de ciencias químicas y farmacéuticas. Santiago, Chile. 55p.

AVELLO M., Pastene E., Bustos E., Bitner M., Becerra J. 2013. Variation in phenolic compounds of *Ugni molinae* populations and their potential use as antioxidant supplement. Revista Brasileira de Farmacognosia Brazilian Journal of Pharmacognosy 23(1):44-50.

BABALOLA I., Shode F. 2013. Ubiquitous Ursolic Acid - A Potential Pentacyclic Triterpene Natural Product. Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry 2(2):214-222.

BARRIENTOS C. 2010. Efecto metabólico de la glucosamina y la dieta alta en grasa en ratas. Tesis de Doctorado en Ciencias Quimicobiológicas. Mexico D. F., Instituto Politécnico Nacional, Escuela Nacional de Ciencias Biológicas. 71p.

BUGUEÑO I. 2015. Evaluación de las propiedades inhibitorias sobre enzimas que regulan la glicemia de extractos de hojas de diferentes genotipos de *Ugni molinae*. Memoria para optar al título de Químico Farmacéutico, Santiago, Chile. Universidad de Chile, Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas. 54p.

CHANDRAN R., Kumar N., Manju S., Kader S., Kumar B. 2015 In Vitro α -Glucosidase Inhibition, Antioxidant, Anticancer, and Antimycobacterial Properties of Ethyl Acetate Extract of *Aegle tamilnadensis* Abdul Kader (Rutaceae) Leaf. Applied Biochemistry and Biotechnology 175:1247-1261.

CODARIO R. 2011. Type 2 diabetes, Pre-Diabetes, and the Metabolic Syndrome, Second Edition. USA, Humana Press. 367p.

COPELAND R. 2000. Enzymes: A Practical Introduction to Structure, Mechanism, and Data Analysis, Second Edition. Wiley-VCH. 390p.

DELPORTE C. Backhouse N., Inostroza V., Aguirre M., Peredo N., Silva X., Negrete R., Miranda H. 2007. Analgesic activity of *Ugni molinae* (murtilla) in mice models of acute pain. Journal of Ethnopharmacology 112:162-165.

GIACCO F., Brownlee M. 2010. Oxidative stress and diabetic complications. Circulation Research 107(9):1058-1070

GOITY L., Quepil M., Jara D., Alegría S., Peña M., Barriga A., Aguirre M., Delporte C. 2013 An HPLC-UV and HPLC-ESI-MS based method for identification of anti-inflammatory triterpenoids from the extracts of *Ugni molinae*. Boletín Latinoamericano y del Caribe de Plantas Medicinales y Aromáticas 12 (1):108-116.

HOU W., Li Y., Zhang Q., Wei X., Pebg A., Chen L., Wei Y. 2009. Triterpene acids isolated from *Lagerstroemia speciosa* leaves as α -Glucosidase Inhibitors. Phytoterapy Research 23:614-618.

HYUN T., Eom S., Kim J. 2014. Molecular docking studies for discovery of plant-derived α -glucosidase inhibitors. Plant Omic Journal 7(3):166-170.

ISLAM M., Jung H., Sohn H., Kim H., Choi J. 2013. Potent α -glucosidase and protein tyrosine phosphatase 1B inhibitors from *Artemisia capillaris*. Archives of Pharmacal Research 36:542-552.

KIM Y., Jeong Y., Wang M., Lee W., Rhee H. 2005. Inhibitory effect of pine extract on alpha-glucosidase activity and postprandial hyperglycemia. Nutrition 21:756-761.

LI Y., Zhou F., Gao F., Bian J., Shang F. 2009. Comparative Evaluation of Quercetin, Isoquercetin and Rutin as Inhibitors of α -Glucosidase. Journal of Agricultural and Food Chemistry 57:11463–11468.

LORDAN S., Smyth T., Soler A., Stanton C., Ross R. 2013. The α -amylase and α -glucosidase inhibitory effects of Irish seaweed extracts. Food Chemistry 141:2170–2176.

MINISTERIO DE SALUD. 2010 Guía clínica diabetes mellitus tipo 2. Santiago. 75p (Series Guías Clínicas MINSAL).

MONTENEGRO, G. 2002. Chile nuestra flora útil: Guía de plantas de uso apícola, en medicina folclórica, artesanal y Ornamental, Universidad Católica de Chile. Santiago, Chile. 241–242.

MORANGONI A. 2003. Enzyme Kinetics: A Modern Approach. USA, Wiley-Interscience. 229p.

PANDEI K., Rizvi S. 2009. Plant polyphenols as dietary antioxidants in human health and disease. Oxidative Medicine and Cellular Longevity 2(5):270-278.

PEÑA M., 2015. Estudio comparativo de la composición química y actividad antioxidante de hojas de distintos genotipos de *Ugni molinae*. Estudio del mecanismo antiinflamatorio de uno de los extractos bioactivos. Primer avance de tesis para optar al grado de Doctor en Ciencias Farmacéuticas, Universidad de Chile, Facultad de ciencias químicas y farmacéuticas. Santiago, Chile. 80p.

PÉREZ R. 2015. Cuantificación de flavonoides y ácido gálico en hojas de distintos genotipos de *Ugni molinae* turcz. y evaluación de su actividad antioxidante. Memoria para optar al título de Químico Farmacéutico. Universidad de Chile, Facultad de ciencias químicas y farmacéuticas. Santiago, Chile. 78p.

RANI M., Raghu K., Nair M., Padmakumari K. 2014. Isolation and Identification of α -Glucosidase and Protein Glycation Inhibitors from *Stereospermum colais*. Applied Biochemistry and Biotechnology 173:946-956.

RHAMAN A., Zareen S., Choudhary M., Akhtar M., Khan S. 2008 α -Glucosidase Inhibitory Activity of Triterpenoids from *Cichorium intybus*. Journal of Natural Products 71(5):910-913.

RUBILAR M., Pinelo M., Ihl M., Schueurmann E., Sineiro J., Nuñez M. 2006. Murta Leaves (*Ugni molinae* Turcz) as a Source of Antioxidant Polyphenols. Journal of Agricultural and Food Chemistry 54: 59-64.

RUBILAR M., Jara C., Poo Y., Acevedo F., Gutierrez C., Sineiro J., Shene C. 2011. Extracts of Maqui (*Aristotelia chilensis*) and Murta (*Ugni molinae* Turcz.) Sources of Antioxidant Compounds and α -Glucosidase/ α -amylase Inhibitors. Journal of Agricultural and Food Chemistry 59:1630-1637.

SEGUEL I., Riveros M., Lehnebach C., Torres A. 1999. Antecedentes Reproductivos y Fenológicos de *Ugni molinae* Turcz. (Myrtaceae). Phyton 65:13-21.

SEGUEL I., Peñaloza E., Gaete N., Montenegro A., Torres A. 2000. Colecta y Caracterización Molecular de Germoplasma de Murta (*Ugni molinae* Turcz.) en Chile. Agro Sur 28(2):32-41.

SUN H., Fang W., Wang W., Hu C. 2006. Structure-activity relationships of oleanane- and ursane-type triterpenoids. Botanical Studies 47: 339-368.

VALENZUELA P. 2015. Evaluación de la actividad antioxidante y determinación del contenido de fenoles totales y flavonoides de hojas de diferentes genotipos de *Ugni molinae* turcz. Memoria para optar al título de Químico Farmacéutico. Universidad de Chile, Facultad de ciencias químicas y farmacéuticas. Santiago, Chile. 65p.

WILHEM DE MÖSBACH E. 1992. Botánica Indígena de Chile. Chile, Editorial Andrés Bello. 140p.

Wu P., Zhang K., Lu Y., He P., Zhao S. 2014. *In vitro* and *in vivo* evaluation of the antidiabetic activity of ursolic acid derivatives. European Journal of Medicinal Chemistry 80:502-508.

XIAO J., Kai G., Yamamoto K., Chen X. 2013. Advance in Dietary Polyphenols as α -Glucosidases Inhibitors - A Review on Structure-Activity Relationship Aspect. Critical Reviews in Food Science and Nutrition 53:818-836.

YIN Z., Zhang W., Feng F., Zhang Y., Kang W. 2014. α -Glucosidase inhibitors isolated from medicinal plants. Food Science and Human Wellness 3:136–174.

ZHANG H., Wang W., Beta T., Dong J. 2015. Inhibitory Properties of Aqueous Ethanol Extracts of Propolis on Alpha-Glucosidase. Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine. 7p.

ZHAO J., Zhou X., Chen X., Wang Q. 2009. α -glucosidase inhibitory constituents from *Toona sinensis*. Chemistry of Natural Compounds 45(2):244-246.

Anexo 1. Fotografías de los testigos herbarios de los diez genotipos de *U. molinae* guardados en el Laboratorio de Productos Naturales de la Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas de la Universidad de Chile



A. SQF22571: murtilla, genotipo 8-2 seleccionado por cantidad de hojas



D. SQF22553: murtilla, genotipo 19-1ha seleccionado por cantidad de hojas



B. SQF22549: murtilla, genotipo 14-4 seleccionado por cantidad de hojas



E. SQF22550: murtilla, genotipo ZF-18 seleccionado por cantidad de hojas



C. SQF22554: murtilla, genotipo 19-1 seleccionado por cantidad de hojas



F. SQF22557: murtilla, genotipo 19-2 seleccionado por la calidad de frutos



G. SQF22553: murtila, genotipo 22-1
seleccionado por calidad de frutos



I. SQF22555: murtila, genotipo 27-1
seleccionado por calidad de frutos



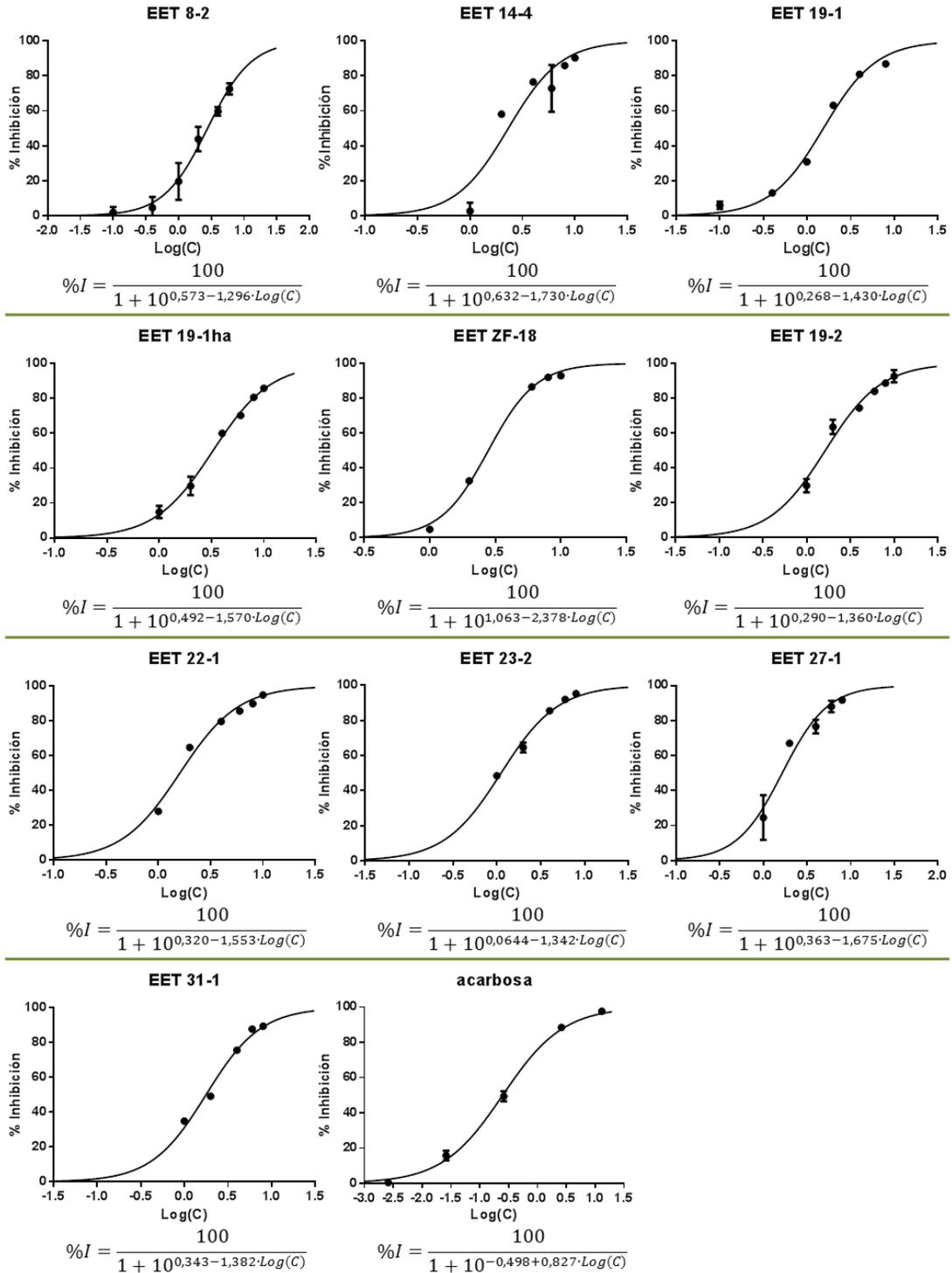
H. SQF22556: murtila, genotipo 23-2
seleccionado por calidad de frutos



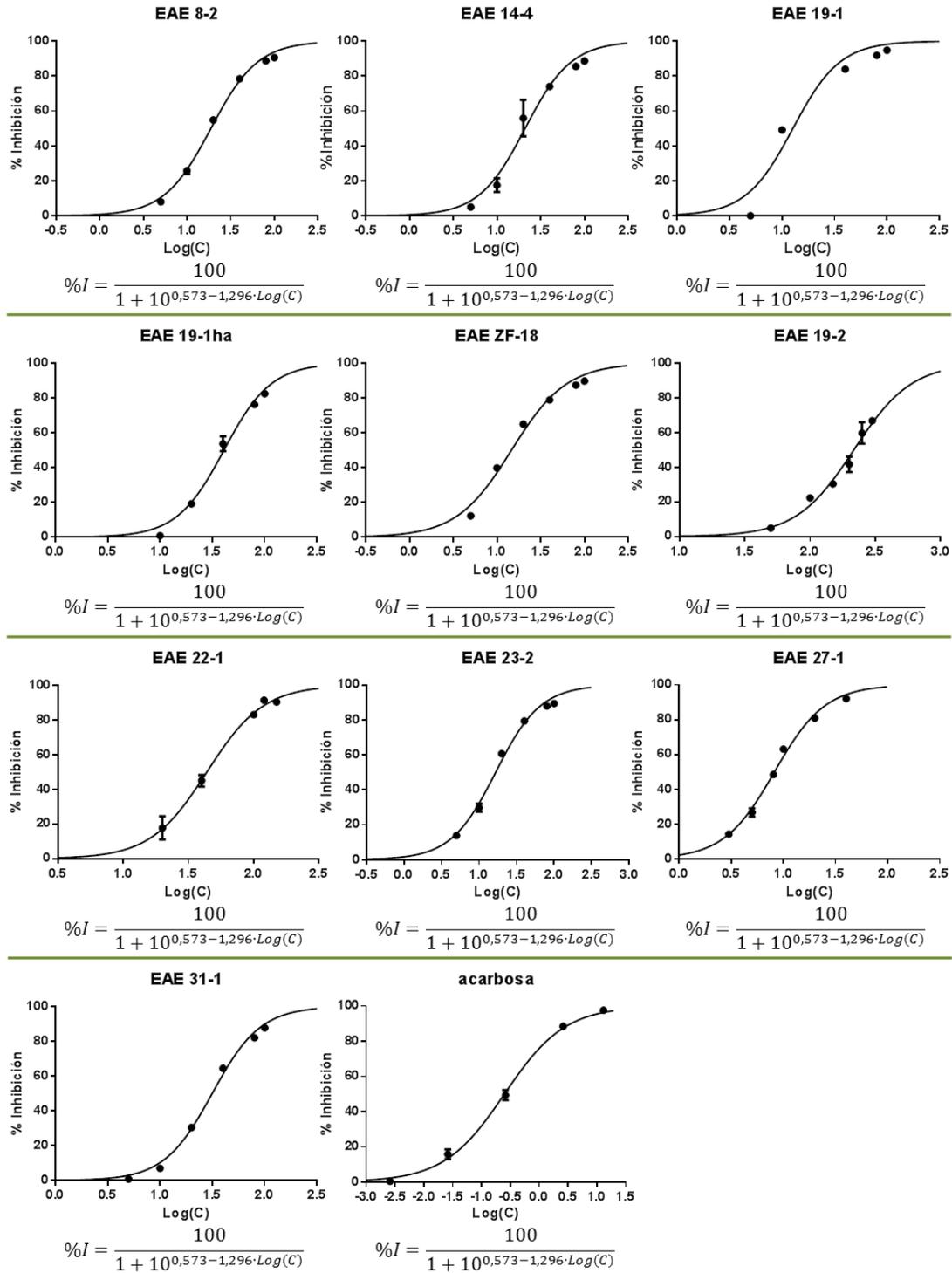
J. SQF22551: murtila, genotipo 31-1
seleccionado por calidad de frutos

Anexo 2. Curvas %inhibición versus Log(C) y sus respectivas funciones

A. EETs y acarbosa



B. EAEs y acarbosa



Anexo 3. Análisis de varianza de los EAEs y EETs

A. ANOVA de una vía para los EAEs

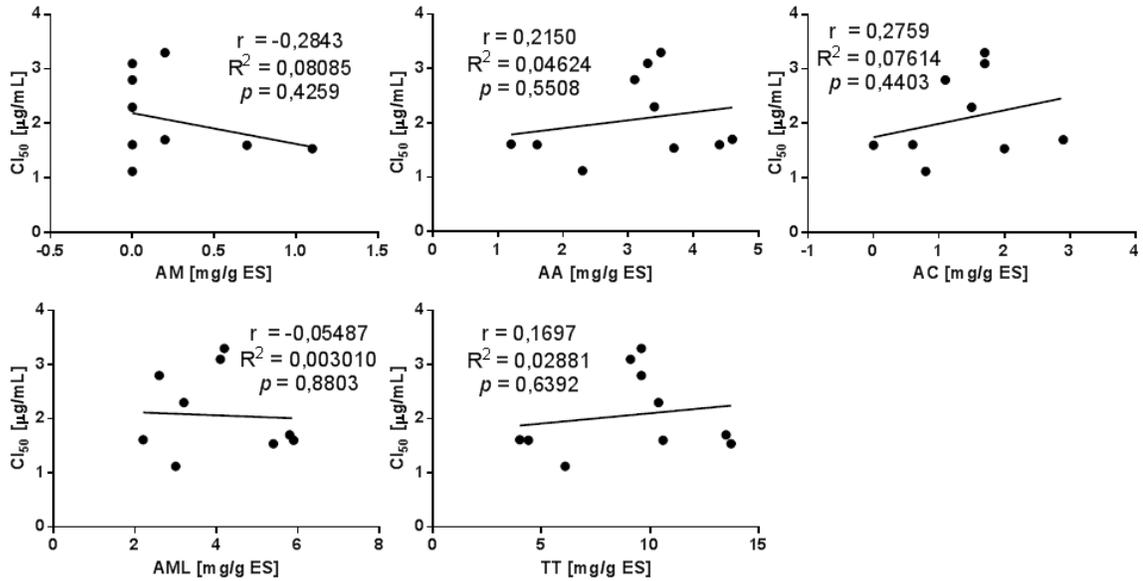
RESUMEN						
Grupos	Cuenta	Suma	Promedio	Varianza		
Cantidad de Hojas	5	108	21,6	128,335		
Calidad de Frutos	5	317,3	63,46	7556,048		
ANÁLISIS DE VARIANZA						
Origen de las variaciones	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Promedio de los cuadrados	F	Probabilidad	Valor crítico para F
Entre grupos	4380,649	1	4380,649	1,140	0,317	5,318
Dentro de los grupos	30737,532	8	3842,192			
Total	35118,181	9				

B. ANOVA de una vía para los EETs

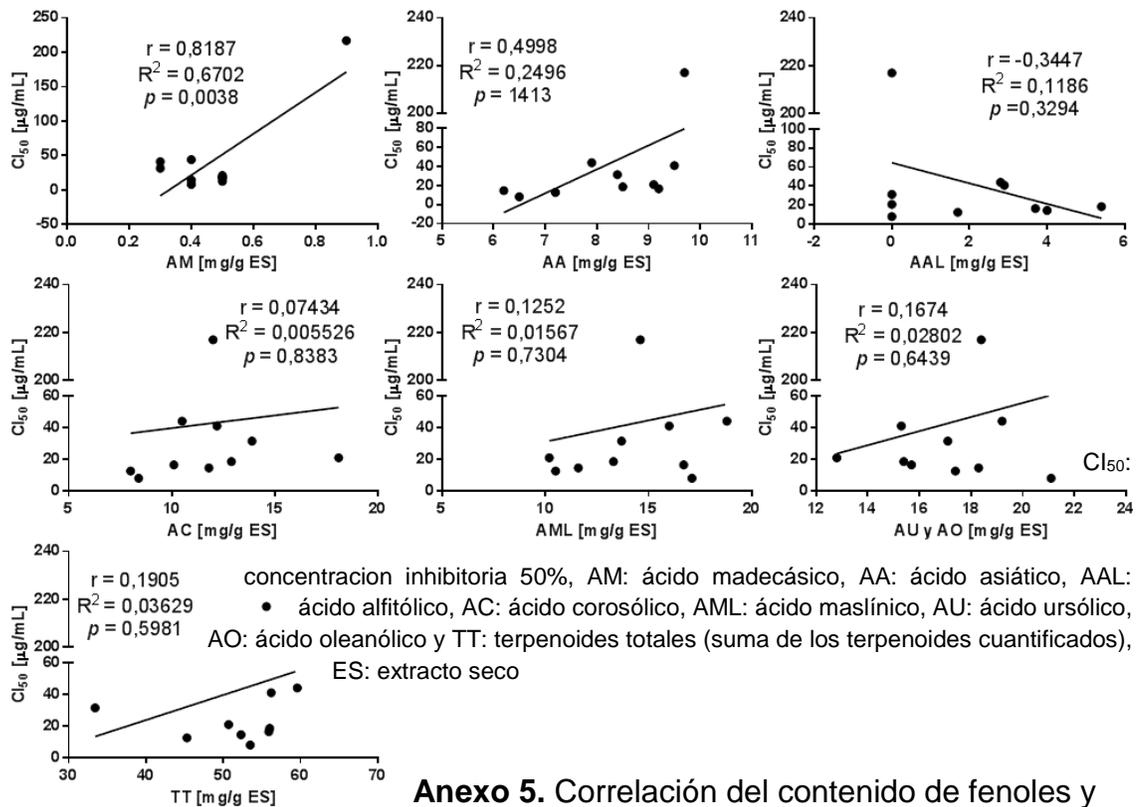
RESUMEN						
Grupos	Cuenta	Suma	Promedio	Varianza		
Cantidad de Hojas	5	13,04	2,608	0,49832		
Calidad de Frutos	5	7,63	1,526	0,05328		
ANÁLISIS DE VARIANZA						
Origen de las variaciones	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Promedio de los cuadrados	F	Probabilidad	Valor crítico para F
Entre grupos	2,927	1	2,927	10,612	0,0116	5,318
Dentro de los grupos	2,206	8	0,276			
Total	5,133	9				

Anexo 4. Correlación de los terpenoides cuantificados y las Cl₅₀

A. EETs

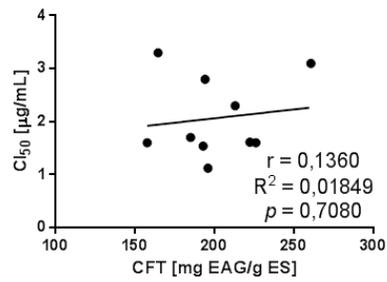
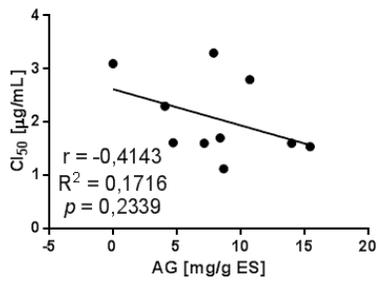
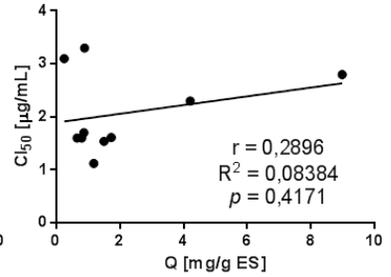
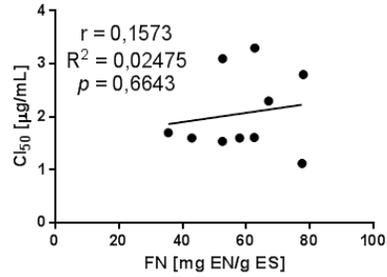
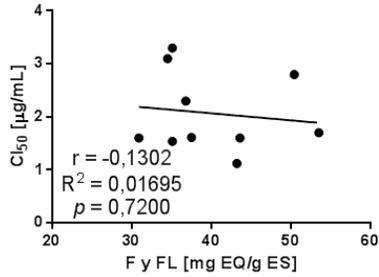


B. EAEs

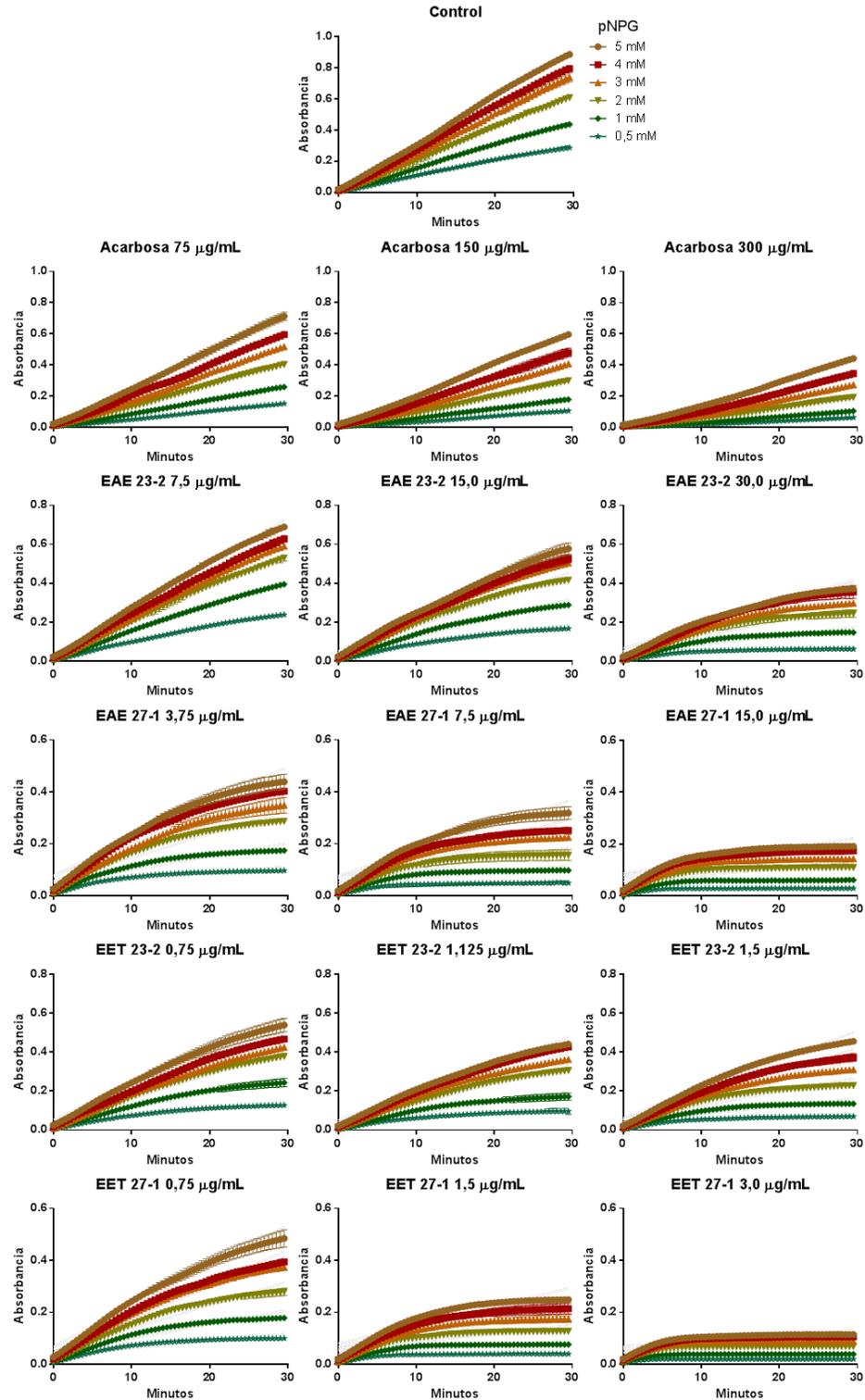


Anexo 5. Correlación del contenido de fenoles y

las Cl₅₀ de los EETs



Anexo 6. Curvas de progresión de acarbosa y extractos más potentes frente a α -glucosidasa



Anexo 7. Resúmenes de congresos asistidos

A. III Congreso Latinoamericano de Plantas Medicinales-Antonio Brack Egg

EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD INHIBITORIA DE EXTRACTOS ETANÓLICOS DE DIEZ GENOTIPOS DE *UGNI MOLINAE* TURCZ. FRENTE A α -GLUCOSIDASA

Veas Rubén^a, Arancibia Jorge^a, Peña Marcelo^a, Cortez Giovanni^a, Seguel Ivette^b, Delporte Carla^a.

^a Laboratorio de Productos Naturales, Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas, Universidad de Chile, Santiago, Chile.

^b INIA, Carillanca, IX Región, Chile.

Ugni molinae Turcz., Myrtaceae conocida normalmente como murta o murtila es un arbusto nativo siempre-verde del centro-sur y sur de Chile. La medicina folclórica chilena le atribuye muchas propiedades y entre sus usos destaca como tratamiento para la diabetes al consumir la infusión de sus hojas y ramas¹. Estudios realizados en nuestro laboratorio han demostrado la presencia de ácidos triterpénicos pentacíclicos como ácido: betulínico, ursólico, oleanólico, corosólico, madecásico, asiático, alfitólico y maslínico² en distintos extractos. Por otra parte se ha demostrado la presencia de polifenoles como: ramnósidos y glucósidos de quercetina, glucósidos de miricetina y canferol, epicatequina y ácido gálico^{3,4}. Para ambas familias de compuestos se han reportado potentes inhibidores de α -glucosidasa. Su inhibición permite la disminución del pico postprandial de glucosa al disminuir la absorción de monosacáridos⁵.

Este estudio tuvo como objetivo evaluar comparativamente los extractos etanólicos (EETs) de 10 genotipos de *U. molinae* Turcz. cultivados en las mismas condiciones endofoclimáticas e igual manejo agronómico obtenidos desde el banco de germoplasma del Instituto de Investigaciones Agropecuarias (INIA), donde 5 fueron seleccionadas por la calidad de sus frutos y los restantes por la cantidad de hojas. Se utilizó un método colorimétrico en que α -glucosidasa (0,2 U/mL) hidroliza el p-nitrofenil- α -D-glucopiranosido, generando un compuesto coloreado (p-nitrofenol) cuya absorbancia fue medida a 400 nm⁶. La misma mezcla de reacción usando acarbosa fue usada como patrón de comparación. El análisis de la significancia de los resultados se realizó mediante ANOVA y Tukey.

Los resultados obtenidos indican al EET del genotipo 23-2 como el más potente con una Cl_{50} de $1,1 \pm 0,07$ μ g/mL, destacando también los EETs de los genotipos 19-1, 19-2 y 22-1 con Cl_{50} de $1,5 \pm 0,001$, $1,6 \pm 0,1$ y $1,6 \pm 0,3$ μ g/mL respectivamente (que no mostraron ser diferentes significativamente). El genotipo que mostró menor potencia corresponde al 19-1ha con un Cl_{50} igual a $3,3 \pm 0,2$ μ g/mL. Todos los EETs mostraron ser más potentes que el compuesto de referencia, acarbosa, con un Cl_{50} de $0,3 \pm 0,04$ mg/mL.

Agradecimientos: FONDECYT 1130155; Becas Conicyt 21130672 y 21120377; INIA, Carillanca, Chile.

Referencias

- 1 RUBILAR M., Jara C., Poo Y., Acevedo F., Gutierrez C., Sineiro J. y Shene C. Extracts of Maqui (*Aristotelia chilensis*) and Murta (*Ugni molinae* Turcz.): Sources of Antioxidant Compounds and α -Glucosidase/ α -Amylase Inhibitors. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2011, 59, 1630–1637.
- 2 GOITY L. E., Queupil M. J., Jara D., Alegría S. E., Peña M., Barriga A., Aguirre M. C. y Delporte C. An HPLC-UV and HPLC-ESI-MS based method for identification of anti-inflammatory triterpenoids from the extracts of *Ugni molinae*. *Boletín Latinoamericano y del Caribe de Plantas Medicinales y Aromáticas* 12 (1): 108 – 116
- 3 RUBILAR M., Pinelo M., Ihl M., Scheuermann E., Sineiro J. y Núñez M. J. Murta Leaves (*Ugni molinae* Turcz) as a Source of Antioxidant Polyphenols. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2006, 54, 59-64.
- 4 DOLL U., Rodríguez I., Soto C. y Razmilic I. Propagación de estacas y concentración de taninos y flavonoides en hojas de dos procedencias de *Ugni molinae* de la región del Maule (Chile). *BOSQUE* 33(2): 203-209, 2012.
- 5 LORDAN S., Smyth T. J., Soler-Vila A., Stanton C. y Ross R. P. The α -amylase and α -glucosidase inhibitory effects of Irish seaweed extracts. *Food Chemistry* 141 (2013) 2170–2176.
- 6 Kim Y. M., Jeong Y. K., Wang M. H., Lee W. Y., Rhee H. I. Inhibitory effect of pine extract on α -glucosidase activity and postprandial hyperglycemia. *Nutrition* 21 (2005) 756–761

- B. Congreso conjunto: XXXVII
Congreso anual de la Sociedad de Farmacología de Chile - XXX Reunión
Anual de la Sociedad Chilena de Ciencias Fisiológicas - XI Reunión
Anual de la Sociedad Chilena de Neurociencia

**ETHYL ACETATE EXTRACTS OF DIFFERENT Ugni MOLINAE TURCZ.
GENOTYPES ABLE TO INHIBIT α -GLUCOSIDASE**

Veas, Rubén¹., Arancibia-Radich, Jorge¹., Peña-Cerda, Marcelo¹., Cortez, Giovanni¹., Seguel, Ivette²., Delporte, Carla¹.,

¹Química Farmacológica y Toxicológica, Ciencias Químicas y Farmacéuticas, Universidad De Chile.

²Instituto de Investigación Agropecuaria, INIA, Carillanca, IX Región, Chile.

Previous studies in our laboratory shown pentacyclic triterpenic acids in different extracts of murtilla leaves (*Ugni molinae* Turcz., Myrtaceae) responsible for inhibitory activity against various enzymes. Between these secondary metabolites can find: asiatic, ursolic, madecassic and corosolic acids, derivatives from ursane; betulinic and alfitolic acids derivatives from lupano and oleanolic and maslinic acids derivatives from oleanane¹. Studies carried out in parallel in our laboratory indicate a high concentration of these metabolites in ethyl acetate extracts (EAEs) of leaves.

Chilean folk medicine attributes many properties to the murtilla and among its uses includes infusions from its leaves and branches to treat diabetes². This use can be explained by way of inhibiting α -glucosidase, an exo-carbohydase that catalyzes the hydrolysis of complex sugars to monosaccharides in the brush border of enterocytes, and if it is inhibited decreases postprandial glucose peak³. Therefore the aim of this study was to benchmarking of EAEs of leaves from seven genotypes of murtilla grown in equal conditions of soil and weather, and same agronomic management, from the gene bank of the Institute of Agricultural Research (IAR) through the methodology describe by Kim et al. (2005) with slight modifications. Statistical analysis was performed using ANOVA and Tukey multiple comparisons method.

The results indicate that the genotype 19-1 was the most potent inhibitor against α -glucosidase from *Saccharomyces cerevisiae* with IC₅₀ equal to 12.7 \pm 0.2 μ g/mL. Genotype 19-1ha was the less potent with IC₅₀ of 41.0 \pm 2.0 μ g/mL. However all genotypes showed better potency than the reference drug, acarbose (IC₅₀ of 267.2 \pm 35 μ g/mL). Previous studies with ethanol extracts showed a similar behavior of genotypes, where the 19-1 is part of genotypes with acceptable power and 19-1ha as less potent.

References:

1 GOITY L. E., Queupil M. J., Jara D., Alegría S. E., Peña M., Barriga A., Aguirre M. C. y Delporte C. An HPLC-UV and HPLC-ESI-MS based method for identification of anti-inflammatory triterpenoids from the extracts of *Ugni molinae*. Boletín Latinoamericano y del Caribe de Plantas Medicinales y Aromáticas 12 (1): 108 – 116

2 RUBILAR M., Pinelo M., Ihl M., Scheuermann E., Sineiro J. y Núñez M. J. Murta Leaves (*Ugni molinae* Turcz.) as a Source of Antioxidant Polyphenols. Journal of Agricultural and Food Chemistry. 2006, 54, 59-64.

3 LORDAN S., Smyth T. J., Soler-Vila A., Stanton C. y Ross R. P. The α -amylase and α -glucosidase inhibitory effects of Irish seaweed extracts. Food Chemistry 141 (2013) 2170–2176.

Acknowledgments: We Are Grateful To FONDECYT N° 1130155, CONICYT Grants N°21130672 And N°21120377, Chile. Thank You To INIA (Carillanca, Temuco) For The Genotypes.