



Universidad de Chile

Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas

Departamento de Química Farmacológica y Toxicológica

Laboratorio de Productos Naturales

**IDENTIFICACIÓN DE LAS PRINCIPALES SAPOGENINAS DE
UNA FRACCIÓN APOLAR OBTENIDA DE LA HIDROLISIS DE
UN EXTRACTO ACUOSO DE *Quillaja saponaria* MOL. Y SU
ACTIVIDAD FRENTE A LA ENZIMA GLICÓGENO
FOSFORILASA A**

Memoria para optar al Título de Químico Farmacéutico

PATRICIO AGUSTÍN TORRES GÓMEZ

Patrocinador (a)

Dra. Q.F. Carla Delporte V.

Director (a)

Dra. Q.F. Carla Delporte V.

Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas

Santiago, Chile

2011

*“El más terrible de los sentimientos es
el sentimiento de tener la
esperanza perdida”*

Federico García Lorca

AGRADECIMIENTOS

Mis agradecimientos al Laboratorio de Productos Naturales de la Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas de la Universidad de Chile, en especial a la profesora Dra. Carla Delporte por su guía en esta memoria de título y por su apoyo en todo este tiempo, tanto en el área académica como en el área humana, lo cual se ve reflejado en el grato ambiente que refleja el equipo que trabaja en Productos Naturales. A David Aravena por su ayuda en todo el proceso de memoria, explicando siempre y dispuesto a ayudar a solucionar los problemas generados en el laboratorio.

Agradezco a mis compañeros de laboratorio que han sido un gran aliciente en esta etapa universitaria, a María José Queupil, Marcelo Peña, Gabriela Valenzuela, Carlos Cartagena, Pamela Zapata, Magdalena Penna, León Goity, Cristian Cáceres, Jessica Bravo, Consuelo Castro, también a compañeros de universidad como Claudio Méndez, Pablo Iturra, Natalia Ibacache, Romina Salinas, Claudia Zuñiga, Pablo López, Valeria Medina, Valeska Rojas, Francisco Fuentes, disculpen si se me ha olvidado alguno...

Un reconocimiento también a quienes trabajaron alguna vez para que esta memoria fuese llevada a buen puerto, tanto en unidad de investigación, como en práctica, a Ana Torres, Constanza Tolg, Valentina Espinoza, Denisse Palma, Fernanda Reyes, Alejandra Fuentes, Katherine Placencia, ya que sin su ayuda habría sido imposible avanzar en lo que exigía esta investigación.

A mis amigos y familiares que me han acompañado en este largo viaje, a los que están y los que nos han dejado este año como es el caso de Javier Lagos y mi tío Fernando Gómez (tío Yoyo), a Gabriel Pastorelli, Ignacio Baehr, Vanesa Venegas, Claudio Jerez...

Por último y creo que el agradecimiento más grande a mi familia, a mis hermanos Danilo y Vicente, y en especial a mis padres Agustín Torres Muñoz y Ana Patricia Gómez, que han sido una piedra de apoyo en tiempos buenos, en tiempos malos, y que sin los valores que me han entregado, la conciencia social y ética por ser un Químico-Farmacéutico no hubiese despertado.

TABLA DE CONTENIDOS

	pág
CAPÍTULO I	
INTRODUCCIÓN.....	1
1.1. Espectrometría de masas y el análisis de las sapogeninas.....	1
1.2. La Diabetes Mellitus y la enzima glicógeno fosforilasa a.....	3
CAPITULO II	
FICHA TÉCNICA DE LA PLANTA.....	5
CAPÍTULO III	
HIPÓTESIS.....	6
CAPÍTULO IV	
OBJETIVOS.....	7
4.1. Objetivos generales.....	7
4.2. Objetivos específicos.....	7
CAPÍTULO V	
MATERIALES Y MÉTODOS.....	8
5.1. Metodología Química.....	8
5.1.1. Proceso de hidrólisis del extracto Ultra Dry 100 Q.....	8
5.1.2. Fraccionamiento del hidrolizado mediante columnas cromatográficas (CC) con relleno gel de sílice 60.....	8
5.1.3. Fraccionamiento por CC de fase reversa con relleno sílica gel C-18.....	9
5.1.4. Fraccionamiento por CC de relleno Sephadex LH-20.....	9
5.1.5. Monitorización por CCF.....	9
5.1.6. Purificación de las fracciones mediante placas preparativas.....	11
5.2. Determinación estructural.....	11
5.2.1. Análisis mediante CLAE-UV-IES-MS.....	11

5.3. Ensayo de inhibición de la glicógeno fosforilasa a	12
5.3.1. Preparación de reactivos.....	12
5.3.2. Consideraciones en la preparación de reactivos.....	13
5.3.3. Cálculo del porcentaje de inhibición (%I).....	14

CAPÍTULO VI

RESULTADOS.....	15
6.1. Análisis Químico.....	15
6.1.1. Producto de hidrólisis.....	15
6.1.2. CC1-Flash del Hidrolizado.....	15
6.1.3. CC2-Silica G 60.....	17
6.1.4. CC3-C18.....	18
6.1.5. CC4-Sephadex.....	18
6.1.6. Placa(s) Preparativa(s).....	19
6.2. Determinación estructural de sapogeninas (CLAE-UV-IES-MS).....	20
6.2.1. Propuesta para el ácido quillaico.....	20
6.2.2. Propuesta para la arjungenina.....	26
6.2.3. Propuesta para la fitolacagenina.....	33
6.3. Ensayo de inhibición de la enzima glicógeno fosforilasa a (GPa).....	40

CAPÍTULO VII

DISCUSIÓN.....	43
7.1. Análisis químico.....	43

7.2. Ensayo de inhibición de la enzima glicógeno fosforilasa a.....44

CAPÍTULO VIII

CONCLUSIÓN.....46

CAPÍTULO IX

BIBLIOGRAFÍA.....47

INDICE DE FIGURAS

	pág
Figura N°1 Metodología CLAE-UV-IES-MS.....	1
Figura N°2 Ionización por electrospray.....	2
Figura N°3 Enzima glicógeno fosforilasa a.....	4
Figura N°4 CCF de Pol-1.....	17
Figura N°5 CCF de Placa Preparativa.....	19
Figura N°6 Cromatograma de la fracción Pol-1.....	20
Figura N°7 MS ¹ para el pico 2.....	21
Figura N°8 Fragmentos principales propuestos para el ácido quillaico	21
Figura N°9 Ruta de fragmentación propuesta para el ácido quillaico.....	22
Figura N°10 Fragmentos propuestos para retro Diels-Alder para el ácido quillaico.....	23
Figura N°11 Otros fragmentos propuestos para retro Diels-Alder para el ácido quillaico.....	24
Figura N°12 Fragmentos propuestos por la ruptura del anillo central del ácido quillaico.....	25
Figura N°13 MS ¹ para el pico 3.....	26
Figura N°14 Fragmentos propuestos para la arjungenina	27
Figura N°15 Ruta de fragmentación propuesta para la arjungenina.....	28
Figura N°16 Otra posible ruta de fragmentación propuesta para la arjungenina.....	29
Figura N°17 Fragmentos propuestos para retro Diels-Alder para la arjungenina.....	30
Figura N°18 Otros fragmentos propuestos para retro Diels-Alder para la arjungenina.....	31
Figura N°19 Fragmentación propuesta para la ruptura del anillo central de la arjungenina.....	32
Figura N°20 MS ¹ para el pico 4.....	33
Figura N°21 Fragmentos propuestos para la fitolacagenina.....	34
Figura N°22 Ruta de fragmentación propuesta para la fitolacagenina.....	35

Figura N°23	Otra posible ruta de fragmentación propuesta para la fitolacagenina.....	36
Figura N°24	Fragmentos propuestos por retro Diels-Alder para la fitolacagenina.....	37
Figura N°25	Otros fragmentos propuestos por retro Diels-Alder para la fitolacagenina.....	38
Figura N°26	Fragmentación propuesta para la ruptura del anillo central de la fitolacagenina.....	39
Figura N°27	% inhibición sobre Gpa versus muestra.....	41
Figura N°28	Sapogeninas del quillay.....	43

INDICE DE TABLAS

	pág
Tabla N°1 CC1- Silica G 60 Flash del Hidrolizado. Fracciones obtenidas vs Fase Móvil.....	16
Tabla N°2 Concentración para cada muestra.....	40
Tabla N°3 Absorbancia obtenida para cada muestra.....	40
Tabla N°4 Porcentaje de inhibición para cada muestra.....	41

INDICE ANEXOS

	pág
Anexo 1.1 Quillay.....	52
Anexo 1.2 Inflorescencia del quillay.....	53
Anexo 1.3 Extracto acuoso seco de biomasa de quillay.....	53
Anexo 2.1 Reacción de Diels-Alder.....	53
Anexo 3.1 Dianas farmacológicas para la Diabetes Mellitus tipo 2.....	54

ABREVIATURAS

A _C	Absorbancia del control negativo
A _{BL}	Absorbancia del blanco del control negativo
A _{muestra}	Absorbancia de la muestra analizada
A _{CNE}	Absorbancia del control no enzimático o blanco muestra
AcEt:	Acetato de etilo
B	Solución de buffer HEPES a pH 7,2
BL	Solución blanco
BS	Solución de buffer + sales a pH 7,2
CLAE-UV-IES-MS	Cromatografía de líquidos de alta eficiencia con detector ultravioleta acoplado a un espectrómetro de masas que ioniza por electrospray
CC	Columna cromatográfica
CCF	Cromatografía en capa fina
CID	Disociación inducida por colisión (equipo de espectrómetro de masas)
cm	Centímetro
CN	Control negativo
CNE	Control no enzimático
DCM	Diclorometano
DMSO	Dimetilsulfóxido
EtOH	Etanol
g	Gramos
G1P	Solución de glucosa-1-fosfato
Gli	Solución de glicógeno
GP _a	Enzima glicógeno fosforilasa a
HCl	Ácido clorhídrico
% I	Porcentaje de inhibición sobre la enzima glicógeno fosforilasa a
m/z	Índice masa/carga
MeOH	Metanol
mg	Miligramo

min	Minutos
mL	Mililitro
mM	Milimolar
MS ¹	Espectro de masa
MS ²	Espectro masa-masa
nm	Nanómetro
PAS	p-anisaldehído, MeOH, ácido acético glacial y ácido sulfúrico
PM	Peso molecular
Pol-1	Grupo de fracciones apolares
Pol-2	Grupo de fracciones de polaridad baja
Pol-3	Grupo de fracciones de polaridad media
Pol-4	Grupo de fracciones de polaridad media-alta
Pol-5	Grupo de fracciones de polaridad alta
PP	Placa preparativa
SD	Solución de detención
μL	Microlitro
μM	Micromolar

RESUMEN

Identificación de las principales sapogeninas de una fracción apolar obtenida de la hidrólisis de un extracto acuoso de *Quillaja saponaria* Mol. y su actividad frente a la enzima glicógeno fosforilasa a

El quillay, *Quillaja saponaria* Mol., perteneciente a la familia Quillajaceae, es un árbol que crece en gran parte de la zona central de Chile tanto en el litoral como en el valle. Este árbol ha sido usado desde la época precolombina como detergente, debido a su gran cantidad de saponinas.

El producto de hidrólisis del extracto acuoso obtenido de la biomasa de quillay, es rico en sapogeninas. Estudios anteriores han reportado la presencia de algunas geninas tales como ácido quillaico, ácido fitolagénico, ácido equinocístico y gipsogenina entre otras.

Las sapogeninas triterpénicas pentacíclicas han demostrado tener efecto inhibitorio sobre la enzima glicógeno fosforilasa a.

Para el presente trabajo se sometió a hidrólisis el extracto acuoso obtenido desde la biomasa de quillay con HCl al 18 % y calentamiento a reflujo. El producto de hidrólisis obtenido se lavó sucesivamente con dos porciones de 10 ml de NaOH 0,05 M para eliminar las trazas de compuestos fenólicos que pudiesen quedar en el producto de hidrólisis. Éste fue fraccionado mediante sucesivas columnas cromatográficas con relleno sílica gel 60, de las cuales se obtuvo 5 grupos de fracciones denominadas Pol-1, Pol-2, Pol-3, Pol-4, Pol-5.

Los 5 grupos de fracciones obtenidos y el producto de hidrólisis fueron evaluados mediante el ensayo de inhibición de la enzima glicógeno fosforilasa a. Los porcentajes de inhibición obtenidos demuestran que estos grupos de fracciones no inhiben la enzima glicógeno fosforilasa a.

La identificación de las geninas minoritarias del producto de hidrólisis, se realizó mediante la metodología CLAE-UV-IES-MS. Los resultados nos permiten postular la presencia de ácido quillaico y otras sapogeninas no reportadas anteriormente, como es el caso de la arjungenina y la fitolacagenina. Para estas tres sapogeninas identificadas se propuso una ruta de fragmentación, la cual al contener puntos comunes para estos núcleos triterpénicos, sería una herramienta útil en la identificación de otras sapogeninas triterpénicas pentacíclicas.

SUMMARY

Identification of major saponins of apolar fraction obtained from the hydrolysis of an aqueous extract of *Quillaja saponaria* Mol and their activity against the enzyme glycogen phosphorylase

Quillay, *Quillaja saponaria* Mol., belonging to the family Quillajaceae, is a tree that grows in large areas of both shores and the valley of Central Chile. It tree has been used since the pre-columbian as a detergent, because of its high content of saponins.

The hydrolysis product of aqueous extract obtained from the quillay's biomass, is rich in saponins. Previous studies reported the presence of certain genins, such as quillaic acid, phytolaccagenic acid, equinocystic acid and gypsogenin, amongst others.

The pentacyclic triterpenic saponins depict an inhibitory effect over the enzyme glycogen phosphorylase a.

For this work was subjected to hydrolysis the aqueous extract obtained from the quillay's biomass, by using 18% HCl, along with reflux heating. The hydrolysis product was repeatedly washed two with 10 ml of 0.05M NaOH, for eliminating traces of phenolic compounds that might remain. The hydrolysis product was fractionated in a silica-gel 60 chromatographic column, from which five fractions were obtained these fractions were named as Pol-1, Pol-2, Pol-3, Pol-4, Pol-5.

Both five fractions and the hydrolized extract were evaluated by the inhibition assay of the enzyme glycogen phosphorylase a. The inhibition percentages obtained showed these fractions failed to inhibit the enzyme glycogen phosphorylase a.

The identify minor genins in the hydrolysis product, we used the CLAE-UV-IES-MS approach. From which we postulate the presence of quillaic acid and previously non-reported saponins, such as arjungenin and phytolaccagenin. For these last saponins, we propose a fragmentation route, which contains common points for these triterpenic nuclei, and hence it may represent a potential approach for the identification of additional pentacyclic triterpenic saponins.

I INTRODUCCIÓN

El quillay, *Quillaja saponaria* Mol., es un árbol endémico de Chile que crece desde Coquimbo a Malleco (IV a IX Región). Se encuentra tanto en el litoral como en el valle central y la precordillera, en terrenos y laderas asoleadas (Hoffmann, 1998).

La corteza de quillay desde antaño se ha utilizado como detergente, debido a la gran cantidad de saponinas que contiene. Esto último motiva su uso también para la fabricación de champú, jabón y pasta de dientes, entre otros (Donoso, 1989; Hoffmann, 1998).

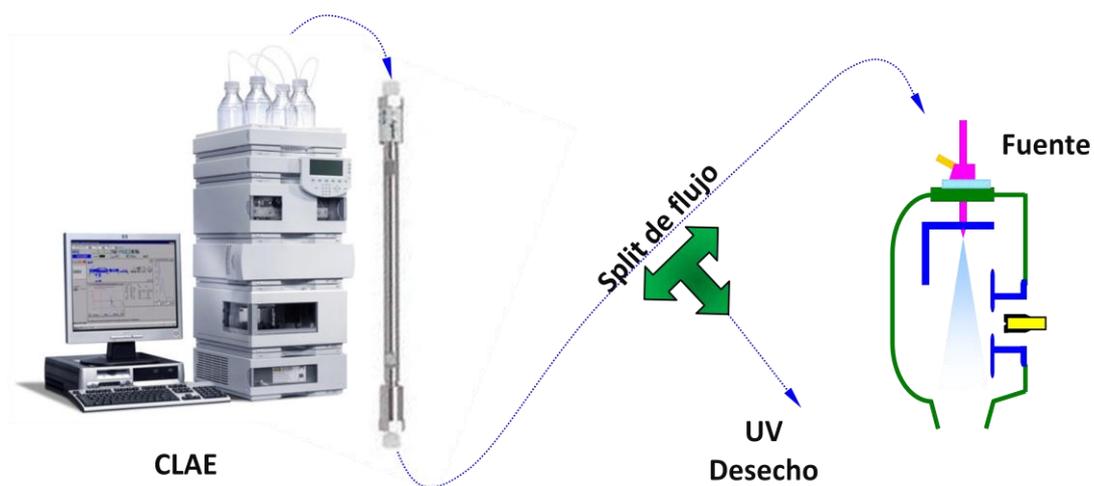
Últimamente, las saponinas del quillay han demostrado actividad citotóxica (Ronnberg, 1995), inmunoestimulante como coadyuvante de vacunas (Palatnik de Sousa *et al.*, 2004) y como antiviral (Roner *et al.*, 2007).

Con respecto a las sapogeninas, su principal compuesto el ácido quillaico, ha demostrado tener efecto analgésico (Arrau *et al.*, 2010) y antiinflamatorio (Rodríguez *et al.*, 2011).

1.1. La espectrometría de masas y el análisis de las sapogeninas

La investigación realizada en esta memoria, se enfocó en el estudio de las sapogeninas contenidas en un grupo de fracciones apolares del extracto acuoso obtenido desde la biomasa de quillay, mediante la metodología analítica de cromatografía líquida de alta eficiencia (CLAE) acoplada a un espectrómetro de masas que ioniza por electrospray (IES-MS).

Figura N°1. Metodología CLAE-UV-IES-MS



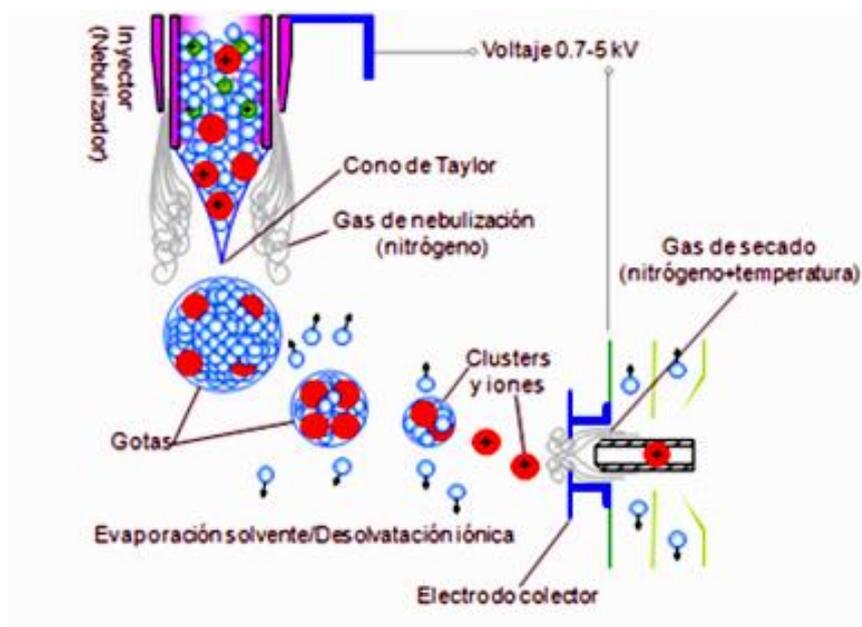
Esta metodología engloba dos equipos distintos, el primero que corresponde a una cromatografía la cual permite separar los distintos compuestos presentes en la muestra en

base a su resolución y que utiliza un detector UV que genera picos cromatográficos en base a las características propias de cada compuestos (absorción de longitud de onda) y no en base a las características del solvente.

El segundo equipo fue un espectrómetro de masas, permite la separación y medición de “masas” con fines analíticos. Esta separación sólo es posible en moléculas cargadas (iones) y en estado gaseoso. El comportamiento de los iones con relación a su masa (índice masa/carga del ión) va a ser fácilmente influenciado por campos eléctricos o magnéticos por lo que pueden dirigirse de forma que permitan su separación rápida y precisas de los iones generados.

Como fuente de iones se utilizó la técnica llamada ionización por electrospray, que genera los iones a partir de moléculas polycargadas las cuales son expuestas a un campo eléctrico, lo cual produce el fenómeno sucesivo de contracción-explosión (explosión de Raleigh), generándose iones en estado gaseoso que serán separados posteriormente en relación a su índice masa/carga. La ventaja de esta ionización versus otras, es que al no utilizar temperatura para desolvatar la muestra, puede servir para muestras que sean termolábiles, como es el caso de proteína o enzimas (Erra-Balsells, 2004).

Figura N°2. Ionización por electrospray



1.2. La Diabetes Mellitus y la enzima glicógeno fosforilasa a

La Diabetes Mellitus es una de las patologías que genera mayor discapacidad y mortalidad especialmente en adultos, ocupando gran parte de los recursos sanitarios en el país.

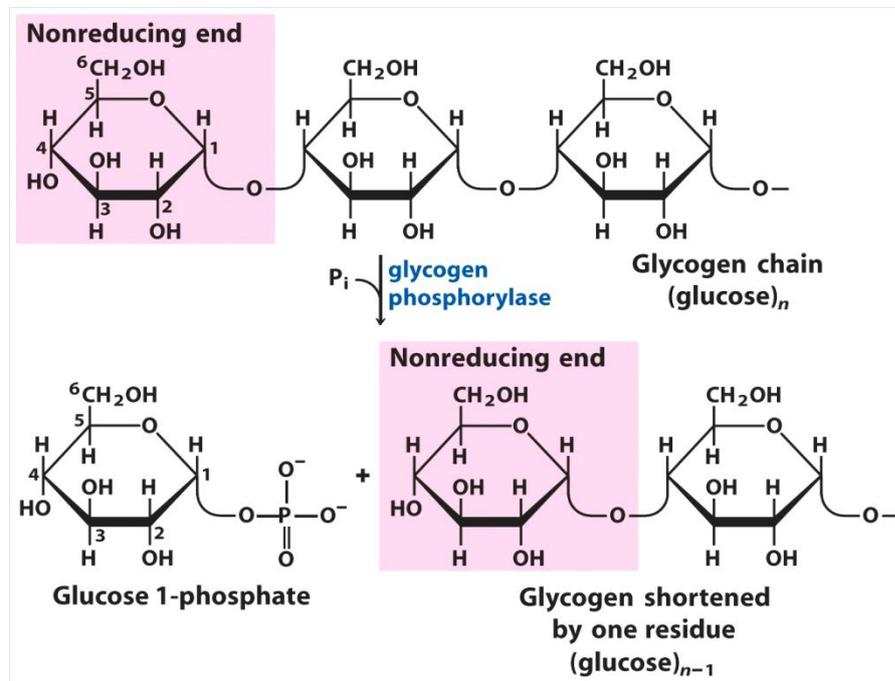
Al año 2000, se estimó que más de 35 millones de personas sufren esta enfermedad en nuestro continente. El 54% corresponde a América Latina y el Caribe, con una proyección de 64 millones al 2025, elevándose a un 62% en nuestra región (Barceló A. *et al*, 2003). De ahí la importancia en el estudio de tratamientos que permitan controlar de mejor manera la patología.

La Diabetes Mellitus es un grupo de enfermedades metabólicas caracterizada por un estado de hiperglicemia, consecuencia de defectos en la secreción y/o acción de la insulina. Ésta puede clasificarse a su vez, en dos tipos:

- Tipo 1, caracterizada por una destrucción de las células beta pancreáticas, que a su vez provoca una deficiencia absoluta de insulina.
- Tipo 2, caracterizada por insulino-resistencia y deficiencia (no absoluta) de insulina.

En el caso de la Diabetes Mellitus tipo 2, que es de mayor prevalencia que la otra, estudios anteriores han reportado que una de las vías para controlar la glicemia sería reduciendo la excesiva producción glucosa hepática. En esta vía se encuentra involucrada la enzima llamada glicógeno fosforilasa a, que *in vivo*, cataliza la eliminación secuencial de residuos glicosídicos desde los extremos no reductores de la molécula de glicógeno.

Figura N°3. Degradación del glicógeno catalizada por la enzima glicógeno fosforilasa



En la literatura se ha reportado el efecto inhibitorio de compuestos con núcleo tritepénico pentacíclico frente a la glicógeno fosforilasa α , entre los cuales se encuentran los derivados del oleanano (Wen *et al.*, 2008).

II FICHA TÉCNICA DE LA PLANTA

Familia: Quillajaceae.

Nombre científico: *Quillaja saponaria* Mol.

Nombre vulgar: quillay.

Sinónimos: Jabón de palo, quillai

Distribución geográfica: En Chile crece entre Coquimbo y Malleco (IV a IX Región). Habita en suelos secos y pobres hasta los 2000 m.s.n.m. (Hoffmann, 1998).

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

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

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

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

Usos folclórico: Expectorante, antiinflamatorio (PDR for Herbal Medicines, 1998).

III HIPÓTESIS

- La fracción apolar obtenida del extracto hidrolizado de quillay presenta a lo menos tres sapogeninas triterpénicas pentacíclicas.
- Las fracciones obtenidas del extracto hidrolizado de quillay inhiben a la enzima glicógeno fosforilasa a.

IV OBJETIVOS

4.1. Objetivos generales

- Evaluar *in vitro* las fracciones obtenidas de un extracto hidrolizado de quillay frente a la glicógeno fosforilasa α .

4.2. Objetivos específicos

- Identificar las sapogeninas presentes en una fracción apolar mediante CLAE-UV-IES-MS.
- Postular una ruta de fragmentación común o similar para las sapogeninas presentes en la fracción apolar.
- Evaluar el potencial efecto inhibitorio frente a la glicógeno fosforilasa α , de las diferentes fracciones del extracto hidrolizado de quillay.

V MATERIALES Y MÉTODOS

5.1. Metodología química

5.1.1. Proceso de hidrólisis del extracto Ultra Dry 100 Q

Ultra Dry 100 Q corresponde a un extracto acuoso purificado, secado en spray y rico en saponinas, procedente de la biomasa de *Quillaja saponaria*, Mol.

Para llevar a cabo el proceso de hidrólisis, se pesaron 20 g de extracto Ultra Dry 100 Q y se mezclaron hasta su disolución con una solución acuosa de 500 mL de HCl al 18%, bajo calentamiento a reflujo por 2 horas. El sólido café obtenido fue filtrado al vacío, para luego ser lavado con abundante agua y después someterlo a dos lavados con 10 mL de NaOH 0,05M. Posteriormente se lavó nuevamente con agua y se llevó el producto a sequedad en estufa a 40 ° C. El sólido café obtenido en estos procesos se denominó como “hidrolizado”.

5.1.2. Fraccionamiento del hidrolizado mediante columnas cromatográficas (CC) con relleno gel de sílice 60

El hidrolizado obtenido en el punto anterior fue fraccionado en CC con relleno gel de sílice 60, técnica llamada “cromatografía rápida seca”, la cual consiste en utilizar vacío en el sistema de la CC para optimizar el proceso.

Con el fin de preparar la cabeza de la columna, el hidrolizado o producto de hidrólisis fue mezclado con igual cantidad de sílica gel 60, para lo cual se usó acetona o diclorometano en un mortero para favorecer la homogenización.

Una vez volatilizado el solvente, el sólido se llevó a su completa sequedad, ya sea en estufa o a temperatura ambiente, originando la “cabeza” de la columna cromatográfica.

En paralelo se pesó una cantidad de sílica gel 60 correspondiente al menos a 5 veces la altura de la cabeza, que a su vez constituirá el “cuerpo” de la columna.

Posteriormente de la elección de la columna, se agregó un papel filtro sobre la frica y se conectó la columna a un matraz Kitasato. Luego el cuerpo de la columna se empaquetó en seco, es decir, se agregó la sílica gel 60 en seco y después se compacta por presión mecánica y finalmente con diclorometano, teniendo cuidado de no dejar espacios en el cuerpo de la

columna. Una vez compactada la sílica gel se agregó un segundo papel filtro, seguido de la cabeza, siempre preocupándose de compactar la columna por presión mecánica (sin solvente). Por último se procedió a colocar un tercer papel filtro y luego algodón o arena de mar.

Para eluir la muestra, se activó el sistema de vacío y se agregó el volumen determinado de fase móvil, dejando eluir hasta que caiga la última gota, recolectando así la primera fracción. El proceso se repitió sucesivamente con distintas mezclas de solventes (ver más adelante).

Las fracciones obtenidas se monitorearon mediante cromatografía en capa fina (CCF). Todas aquellas que presentaron perfil cromatográfico similar fueron reunidas en una y rotavaporadas para su posterior separación ya sea por otra columna de sílica gel, sephadex o cromatografía de fase reversa con relleno sílica gel C-18.

5.1.3. Fraccionamiento por CC de fase reversa con relleno sílica gel C-18

Las muestras de sapogeninas apolares extraídas del fraccionamiento anterior fueron disueltas en una cantidad mínima de metanol y luego filtradas en caso que quedase sólido remanente. La solución preparada se incorporó a una CC de fase reversa con relleno sílica gel C-18 y luego eluída.

La fase móvil utilizada en este caso fue solamente metanol, recolectándose aproximadamente 30 fracciones. El monitoreo de la composición química de cada fracción fue mediante CCF (ver punto 5.1.5)

5.1.4. Fraccionamiento por CC de relleno Sephadex LH-20

Las fracciones de interés extraídas fueron disueltas en una mezcla de hexano: diclorometano: metanol (6: 2: 1) e incorporadas a la CC. La fase estacionaria en este caso es Sephadex LH-20 y la fase móvil utilizada fue una mezcla de hexano: diclorometano: metanol (6: 2: 1). El monitoreo de las fracciones obtenidas fue mediante CCF (ver punto 5.1.5).

5.1.5. Monitorización por CCF

Para el monitoreo de las distintas fracciones mediante CCF se utilizó una cámara saturada con un sistema de solventes (fase móvil), en la cual se introdujo el cromatofolio de sílica gel 60 F₂₅₄ que contiene en la parte inferior la muestra a estudiar. El solvente sube por

capilaridad en el cromatofolio, arrastrando y separando los distintos componentes de la muestra, por medio de sus diferencias de polaridad.

Para el análisis cualitativo de los componentes de la muestra se puede recurrir a su R_f , que corresponde a una proporción entre la distancia que recorre el compuesto en el cromatofolio y la distancia total recorrida por el solvente. Además de este dato específico se utilizaron principalmente patrones de comparación obtenidos anteriormente o de la misma muestra.

El sistema de solventes utilizados en la cámara fue AcEt:DCM 1:1, en el caso del fraccionamiento por CC con sílica gel 60. En el caso de utilizar CC de fase reversa con relleno sílica gel C-18 el sistema usado fue DCM: AcEt 9:1, mientras que el agente revelador fue una mezcla de p-anisaldehído, MeOH, ácido acético glacial y ácido sulfúrico (PAS).

La adición del agente revelador fue por medio de un rocío con un pulverizador, luego se calentó el cromatofolio en placa calefactora a 100 °C hasta la aparición de la coloración. Las sapogeninas revelan de color morado.

5.1.6. Purificación de las fracciones mediante placas preparativas

La placa preparativa de sílica gel (PP) permite separar los distintos componentes de una fracción que tengan R_f considerablemente distintos, debido a que la placa de vidrio contiene una mayor cantidad del soporte, permitiendo sembrar una mayor cantidad de muestra. Una vez finalizado el proceso se puede raspar la placa de vidrio en la zona en que se encuentra(n) el o los compuesto(s) de interés y después por filtración se separan del soporte.

Los datos específicos de la PP utilizada son los siguientes:

- Dimensiones: Placa de vidrio de 20 x 20 cm
- Adsorbente: Sílica Gel 60 G
- Fase Móvil: Diclorometano:Acetato de etilo 9:1 (cámara saturada)

Una vez eluída la muestra se debe marcar la placa a 1 cm aproximadamente del borde para revelar solamente esta zona con PAS, ya que dicha zona no podrá ser recuperada. Por último, la muestra recuperada debe ser filtrada tal como fue señalado anteriormente con el fin de eliminar los remanentes de sílica presentes en el o los productos.

5.2. Determinación estructural

5.2.1. Análisis mediante CLAE-UV-IES-MS

Para la determinación de la(s) estructura(s) de cada compuesto se utilizó espectrometría de masas y comparación con los datos obtenidos de publicaciones anteriores.

Los análisis fueron realizados en un CLAE-UV-IES-MS, que consistió de un sistema CLAE Agilent 1100 (Agilent Technologies Inc.) acoplado al espectrómetro de masas de tipo electrospray-trampa iónica IES-IT Esquire 4000 (Bruker Daltonik GmbH, Alemania). Para el control del sistema CLAE se utilizó el programa ChemStation for LC 3D Rev. A.10.02 (Agilent Technologies Inc., CA-USA) y para el control del espectrómetro se utilizó el programa esquireControl 5.2 (Bruker Daltonik GmbH, Alemania).

Para la separación CLAE se utilizó una columna Zorbax Eclipse XDB-C18 150 X 4.6 mm, 5 μm y 80 Å (Agilent Technologies Inc., CA-USA), a la salida de la columna se conectó un Split que dividió el flujo hacia el detector UV y al espectrómetro de masas. La separación de 20 μL de la muestra se realizó a temperatura ambiente utilizando la fase móvil ácido fórmico 0.1 % v/v y acetonitrilo en razón 40 %:60 % mediante un programa isocrático a un flujo de 0.8 mL/min y registro UV a 201 nm.

El proceso de ionización (nebulización) mediante electrospray se realizó a 3000 V asistido por nitrógeno como gas nebulizador a una temperatura de 325 °C, presión de 30 psi y flujo de 10 L/min. Los cromatogramas y espectros de masas se adquirieron en polaridad positiva y negativa para el intervalo de barrido de 20-1000 m/z, utilizando barrido estándar y resolución normal (velocidad de barrido 13000 m/z/s; ancho de peak 0.6 FWHM/m/z). La trampa de iones se utilizó bajo modo de control de carga de iones (ICC activado). La disociación inducida por colisión (CID) se efectuó mediante helio presente en la trampa. La fragmentación se realizó utilizando los siguientes parámetros: SmartFrag, 30-200 %; amplitud de fragmentación, 1.00 V; tiempo de fragmentación, 40 ms; ancho de aislamiento MS (n), 4 m/z; promedios MS (n), 5; número de iones precursores AutoMS (2), 5 señales; y la intensidad umbral AutoMS (2) se fijó previo a cada inyección. Adicionalmente, para la selección de los iones precursores se utilizó modo de exclusión activa (análisis dependiente de datos) bajo los siguientes parámetros: exclusión, 2 espectros; tiempo de exclusión, 1 minuto.

5.3. Ensayo de inhibición de la glicógeno fosforilasa a

La evaluación de la actividad inhibitoria sobre la enzima glicógeno fosforilasa a (GPa) de músculo de conejo se determinó mediante un lector de micro placas basándose en el método modificado de Martin *et al* (1998). La actividad de la enzima fue medida en dirección de la síntesis de glicógeno por liberación de fosfato desde glucosa-1-fosfato. Las muestras utilizadas fueron disueltas en DMSO y diluidas a diferentes concentraciones para la determinación del porcentaje de inhibición.

El equipo utilizado para el ensayo es Brotek ELx800, a su vez usando lector de absorbancia para microplaca y el software usado fue Gen 5 microplaca data collection of analysis.

La enzima se agregó a un volumen total de 100 μ L de tampón que contiene HEPES 50 mM (pH 7.2), KCl 100 mM, MgCl₂ 2.5 mM, EGTA 2.5 mM, glucosa-1-fosfato 0.5 mM, glicógeno 1 mg/mL, y las muestras. La absorbancia de todas las muestras fueron medidas a 655 nm luego de 5 minutos de la adicción de 150 μ L HCl 1M, molibdato de amonio 10 mg/mL y verde de malaquita 0.38 mg/mL como solución de detención (SD), posterior a un tiempo de reacción de 25 minutos a 22°C.

5.3.1. Preparación de Reactivos

Blanco (BL)

Para esta solución se utilizaron dos pocillos que contienen 60 μ L de solución de Buffer HEPES 50 mM pH 7.2 (B); 40 μ L solución Buffer y sales pH 7.2 (BS); 10 μ L de DMSO, y 150 μ L de solución detención.

Posteriormente leer a 660 nm en microplaca (la solución no debe colorearse verde).

Control negativo (CN)

Se preparó una solución de GPa 40 μ g/mL, tomando como punto de partida una solución madre de 100 μ g/mL, considerando que la solución preparada debe ser cantidad suficiente para todas las muestras (en sextuplicado). La alícuota empleada es de 10 μ L, procurando mantener la solución en frío.

En cada pocillo se procedió, agregando 40 μ L de solución BS; 10 μ L de DMSO; 25 μ L de solución de glicógeno 4 mg/mL (Gli). La solución preparada se homogeneizó para luego agregar 25 μ L de solución glucosa-1-fosfato 1 mM (G1P); 10 μ L de GPa 40 μ g/mL. Como

paso siguiente se cronometró 25 minutos, para luego una vez acabado este tiempo agregar 150 μL de SD.

Después de 5 minutos se lee a 660 nm.

Si el promedio de las absorbancias obtenidas es inferior 0,400 se debe modificar la concentración de la solución enzimática. Una vez realizada la modificación, se procedió del mismo modo anterior.

Control no enzimático (CNE)

Tiene por función la determinación del fosfato residual. La solución utilizada debe contener 40 μL BS; 100 μL de B; 10 μL de solución de muestra; 25 μL de Gli; 25 μL de G1P y posteriormente al pasar los 25 minutos cronometrados se procede a agregar 150 μL de SD y después de 5 minutos se lee a 660 nm.

Evaluación de muestras (M)

Se procedió por sextuplicado en la placa para cada muestra, agregando 40 μL de BS; 10 μL de solución de muestra; 25 μL de Gli, luego se homogeneizó con pequeños golpecitos la placa evitando salpicaduras, para luego agregar 25 μL de G1P; 10 μL de GPa 40 $\mu\text{g}/\text{mL}$ y cronometrar 25 minutos. Posteriormente se procedió a agregar 150 μL de SD y después de 5 minutos se lee a 660 nm.

5.3.2. Consideraciones en la preparación de reactivos

- Todo material empleado en la preparación de los siguientes reactivos debe estar libre de ión fosfato. Para ello el lavado debe ser con jabones libres de fosfato y posterior enjuague exhaustivo con agua destilada y finalmente con agua Mili-Q.
- Revisar que los reactivos como SD tenga coloración amarillo-café y sin sedimentos o precipitados, ya que cualquier cambio en los reactivos o en la muestra afectará a la absorbancia en el lector.

5.3.3. Cálculo del porcentaje de inhibición (% I)

La solución denominada control negativo (CN) presenta la máxima actividad que puede alcanzar la enzima bajo nuestras condiciones experimentales, debido a que ésta no presenta ningún tipo de inhibición y se le asigna el valor de 100% de actividad. El valor anterior debe ser corregido mediante la sustracción del valor que otorga el blanco (A_{BL}) el cual corresponde a la absorbancia que otorga el lector de microplaca frente al medio de detención (SD).

La absorbancia de la muestra a analizar debe ser corregida mediante la sustracción del control no enzimático o blanco muestra (CNE), para descartar la interferencia de absorbancia que por sí sola posee la muestra. Por lo tanto, la fórmula de porcentaje de inhibición es la siguiente:

$$\%I = \left[\frac{(A_{CN} - A_B) - (A_{muestra} - A_{CNE})}{(A_{CN} - A_B)} \right] * 100$$

- %I : Porcentaje de inhibición de GPA
- A_{CN} : Absorbancia del control negativo
- A_{BL} : Absorbancia del blanco del control negativo
- $A_{muestra}$: Absorbancia de la muestra analizada
- A_{CNE} : Absorbancia del control no enzimático o blanco muestra

VI RESULTADOS

6.1. Análisis químico

6.1.1. Producto de hidrólisis

Utilizando como materia prima el extracto Ultra Dry 100 Q, se obtuvo un $40,4 \pm 2,0$ % g de rendimiento del producto de hidrólisis. El rendimiento obtenido no varió considerablemente al someterlo a dos lavados con 10 mL de NaOH 0,05 M con el fin de eliminar residuos de compuestos polifenólicos.

6.1.2. CC1-Flash del Hidrolizado

El producto de hidrólisis se sometió a un fraccionamiento mediante CC de sílica gel 60 (0,0063-0,2 mm). Para obtener una cantidad suficiente de Pol-1 se realizaron 20 CC aproximadamente, debido a que dicha fracción presentó un bajo rendimiento ($2,0 \pm 1,9$ %).

Las condiciones específicas para montar CC-Flash son las siguientes:

- Fase Móvil: 200 mL
- Cabeza: 1,2 cm ($7,0 \pm 0,6$ g muestra + 7,0 g de sílica gel)
- Cuerpo: 19 cm
- Diámetro de columna: 5,5 cm
- Altura algodón: 1,2 cm

La composición de la fase móvil fue descrita en la **Tabla N°1**.

Tabla N°1. CC1- Sílica gel 60 Flash del Hidrolizado. Fracciones obtenidas vs Fase Móvil

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

Todas las fracciones con perfil cromatográfico similar fueron reunidas en una y concentrada en un rotavapor. De esta forma se obtuvieron 5 grupos de acuerdo con su polaridad:

- Pol-1: fracciones 1-4 (fracciones apolares)
- Pol-2: fracciones 5-9 (fracciones de polaridad baja)

- Pol-3: fracciones 10-15 (fracciones de polaridad media)
- Pol-4: fracciones 16-22 (fracciones de polaridad media-alta)
- Pol-5: fracciones 23-25 (fracciones de polaridad alta)

6.1.3. CC2-Sílica gel 60

El grupo Pol-1 fue sometido a un fraccionamiento mediante una CC (CC2) con relleno gel de sílice 60 (0,0063-0,2 mm) con las siguientes condiciones de columna:

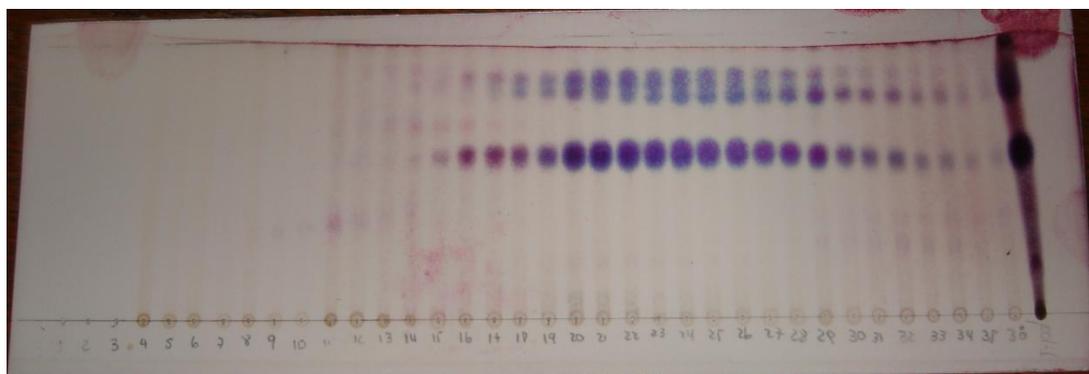
- Fase móvil: 100 mL
- Cabeza: 0,5 cm (1,0 g muestra + 1,0 g sílica)
- Cuerpo: 24 cm
- Diámetro de columna: 4,5 cm
- Arena: 1 cm

Se recolectaron 61 fracciones que fueron eluidas con mezclas de diclorometano: acetato de etilo de polaridad creciente. La mezcla fue incrementándose en acetato de etilo en razón de un 1% en su composición. Cuando se llegó a un 100% acetato de etilo la columna fue finalizada utilizando etanol 100%. El volumen de cada fracción recolectada fue de 200 mL.

El medio de desarrollo de las CCF fue de diclorometano: acetato de etilo (9:1) y el agente revelador PAS.

Mediante CCF se detectaron a lo menos dos grupos de sapogeninas las cuales son visibles en la **Figura N°4**.

Figura N°4. CCF de Pol-1



Los grupos de sapogeninas contenidas en Pol-1 no fueron aisladas mediante CC2, por lo cual fue necesario utilizar una tercera CC con relleno de gel de sílice C-18.

6.1.4. CC3-C18

Pol-1 fue nuevamente fraccionado en una CC, pero esta vez, con relleno de gel de sílice C-18, obteniéndose 30 fracciones de esta columna. Las condiciones utilizadas para montar la columna cromatográfica fueron las siguientes:

- Peso de muestra: $50,1 \pm 0,1$ mg
- Peso de gel de sílice C18: 30 g (7 cm de altura)
- Diámetro de columna: 2 cm
- Fase Móvil: 100 mL
- Solvente: metanol
- Tiempo de recolección: 4 min

Debido que en las CC con relleno de gel de sílice C-18 sólo se puede utilizar metanol o mezclas de metanol-agua, se optó por utilizar metanol. Sin embargo como la solubilidad de Pol-1 en metanol es mínima, el volumen de disolución de la muestra fue de 7 mL aproximadamente.

Las fracciones de interés (15-30) contenían como mínimo dos posibles geninas, las cuales no pudieron ser separadas por esta CC, ya que estaban en poca cantidad y eluían juntas, por lo tanto se optó por evaluar un nuevo adsorbente como Sephadex LH-20 y esta forma se realizó la CC4 que se detalla a continuación.

6.1.5. CC4-Sephadex

A partir de las fracciones de interés 15-30 señaladas anteriormente, éstas fueron nuevamente fraccionadas mediante una nueva CC denominada CC4 con relleno Sephadex LH-20 para separar la mezcla de compuestos presentes en forma mayoritaria en Pol-1.

Los datos específicos para la CC4-Sephadex son los siguientes:

- Peso muestra: 788 mg
- Fase móvil: hexano: diclorometano: metanol 6: 2: 1
- Volumen de disolución: 20 mL
- Diámetro columna: 35 cm

- Tiempo de recolección: 30 s

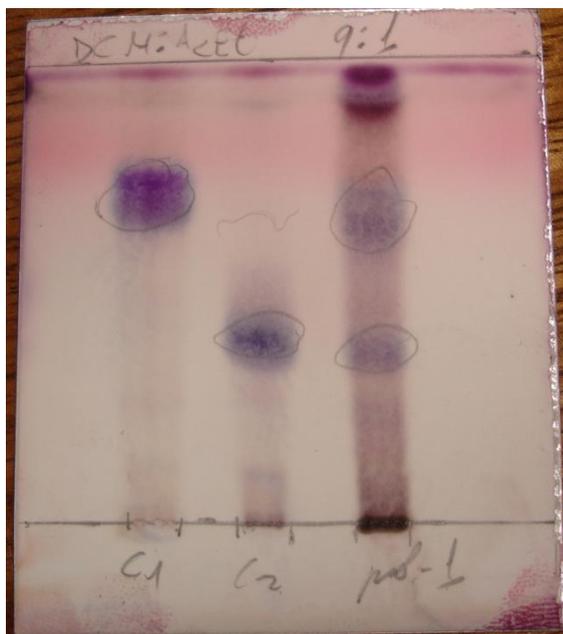
Esta columna al igual que las anteriormente descritas no permitió separar dicha mezcla.

6.1.6. Placa(s) Preparativa(s)

Con el fin de separar los compuestos contenidos en las fracciones 15-30, señalados en el párrafo anterior, se utilizaron placas preparativas de gel de sílice G-60. Esta técnica permitió detectar dos mezclas de al menos dos compuestos. A la mezcla mayoritaria se le denominó C₁, y C₂ a la mezcla minoritaria. Cabe resaltar que C₂ no había sido detectado el CCF anteriores. Sin embargo debido al bajo rendimiento y a la no purificación completa de los compuestos presentes en ambas mezclas, se optó por la identificación de éstos a través de CLAE-UV-IES-MS.

Los grupos de saponinas presentes en la muestra son señalados en la **Figura N°5**.

Figura N°5.CCF de Placa Preparativa

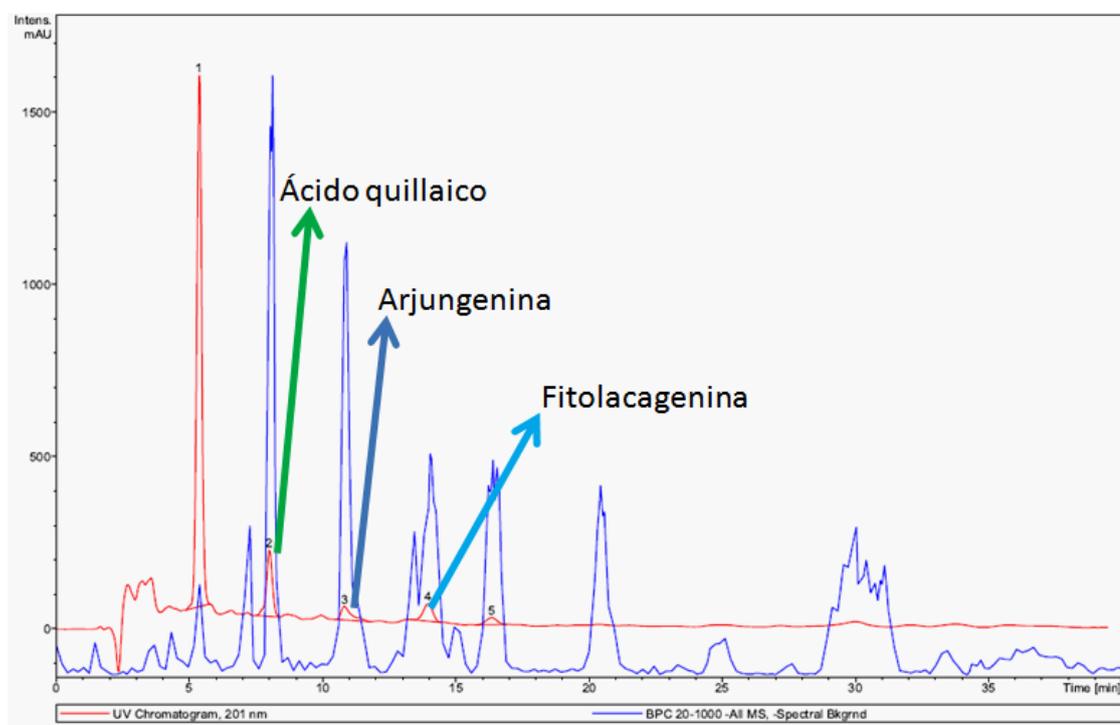


6.2. Determinación estructural de sapogeninas (CLAE-UV-IES-MS)

Para el análisis y dilucidación de las estructuras de las sapogeninas contenidas en Pol-1, se utilizó la técnica CLAE-UV-IES-MS. Además se propuso una ruta de fragmentación para cada una de las sapogeninas.

En el cromatograma CLAE-UV (**Figura N°6**) se detectaron cinco picos de los cuales los 2, 3 y 4 corresponden a sapogeninas (como se discutirá más adelante).

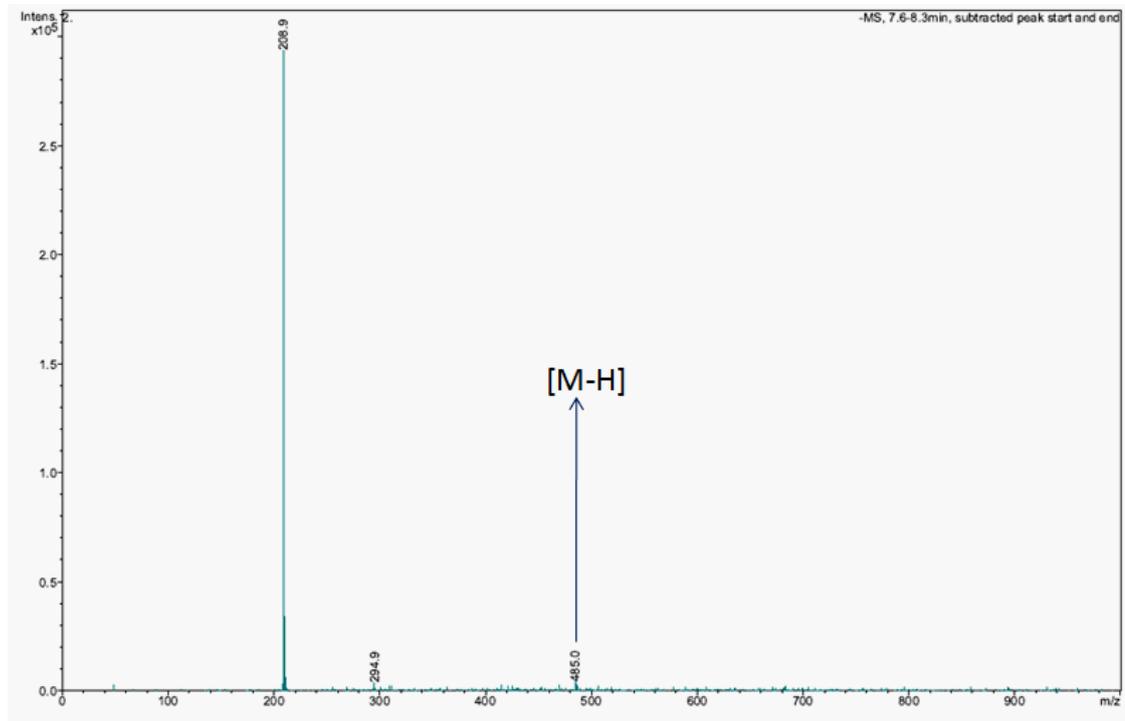
Figura N°6. Cromatograma de la fracción Pol-1



6.2.1. Propuesta para el ácido quillaico

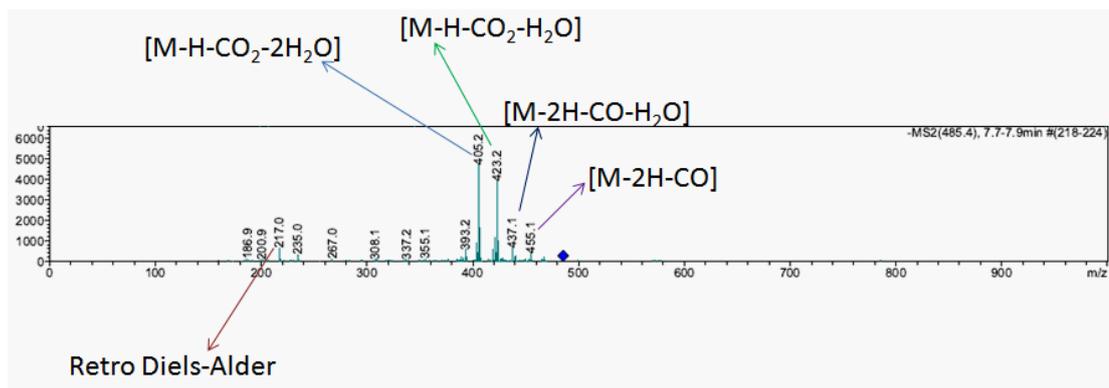
El pico 2 por su ión molecular $[M-H] = 485,4$ corresponde al ácido quillaico (PM = 486 g/mol) y su tiempo de retención fue 8 minutos para esta sapogenina. En la **Figura N°7** se señala el ión molecular para el ácido quillaico.

Figura N°7. MS¹ para el pico 2



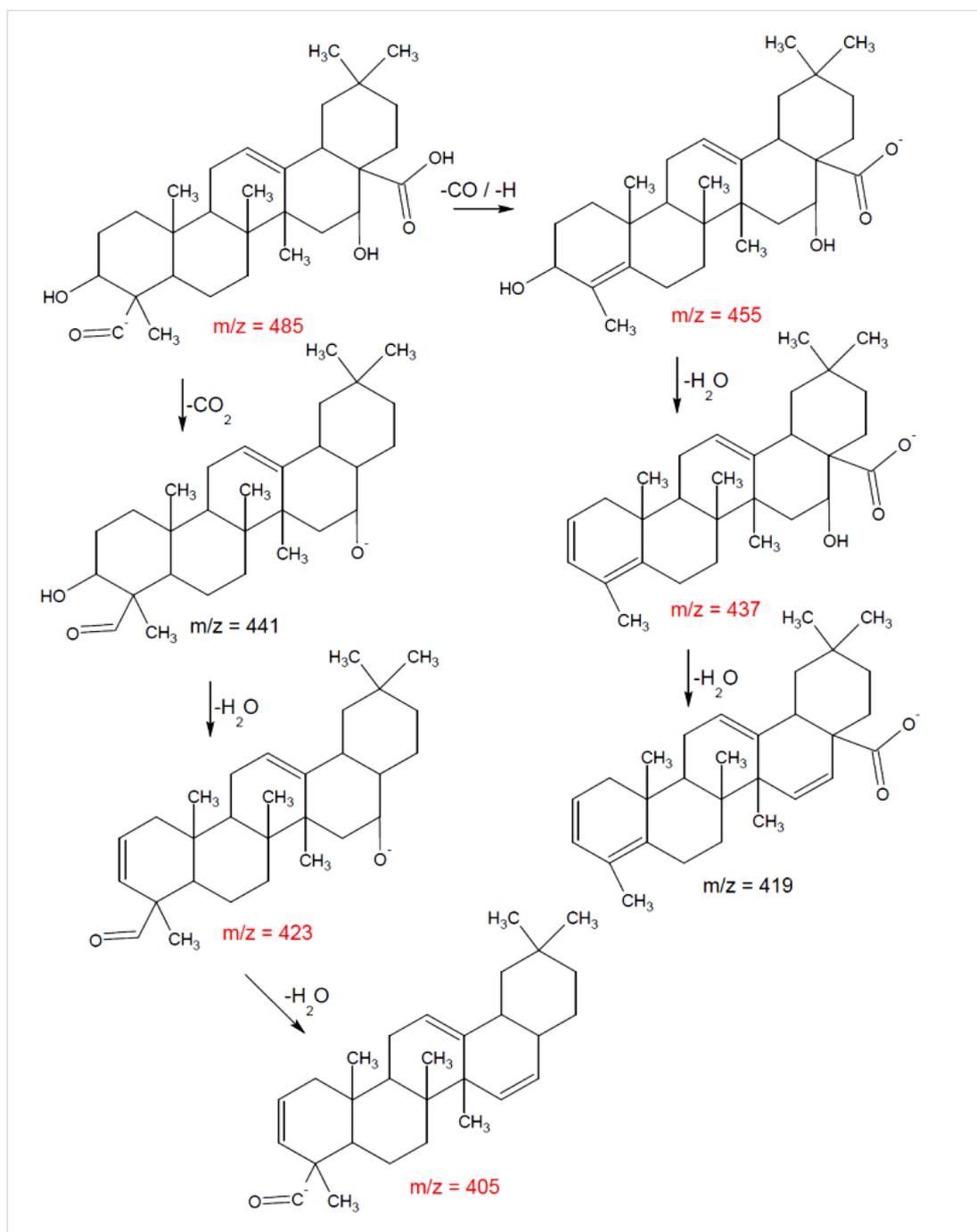
La propuesta de una posible ruta de fragmentación de acuerdo a los fragmentos encontrados se presenta en la **Figura N°8**:

Figura N°8. Fragmentos principales propuestos para el ácido quillaico



Para las señales descritas en la **Figura N°8**, la ruta de fragmentación propuesta es la presentada en la **Figura N°9**, señalando en rojo la m/z de los fragmentos encontrados experimentalmente.

Figura N°9. Ruta de fragmentación propuesta para el ácido quillaico



Con respecto a los fragmentos generados del ácido quillaico mediante la reacción retro Diels-Alder se propuso la siguiente ruta (**Figura N°10**):

Figura N°10. Fragmentos propuestos para retro Diels-Alder para el ácido quillaico

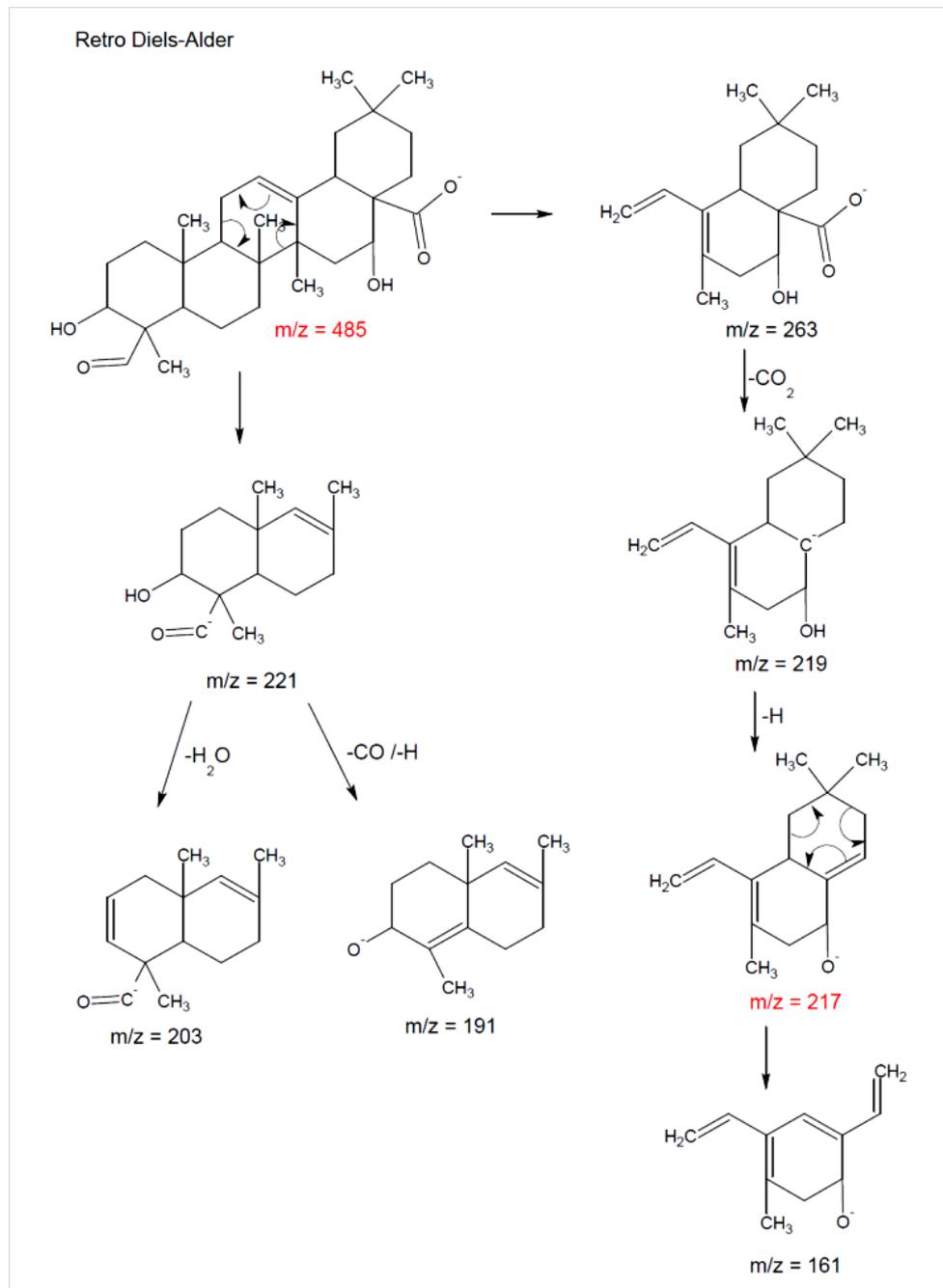
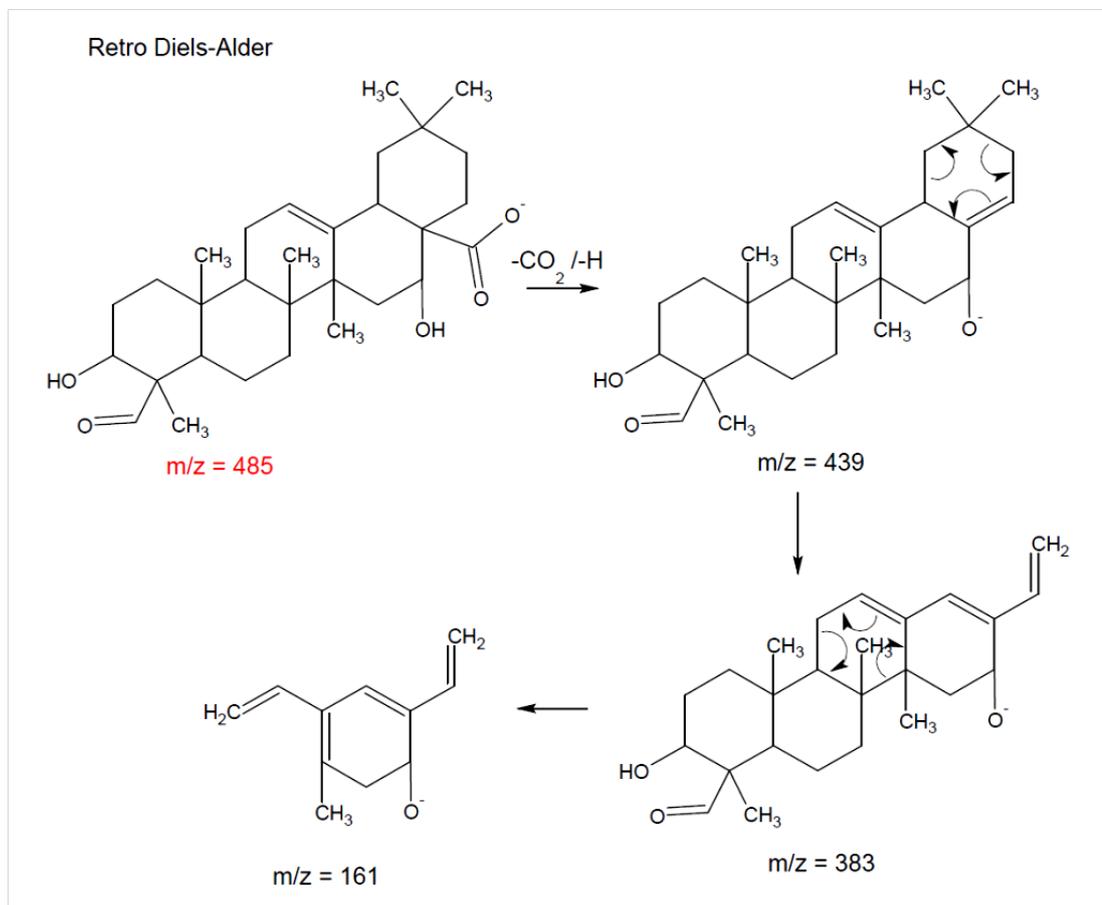
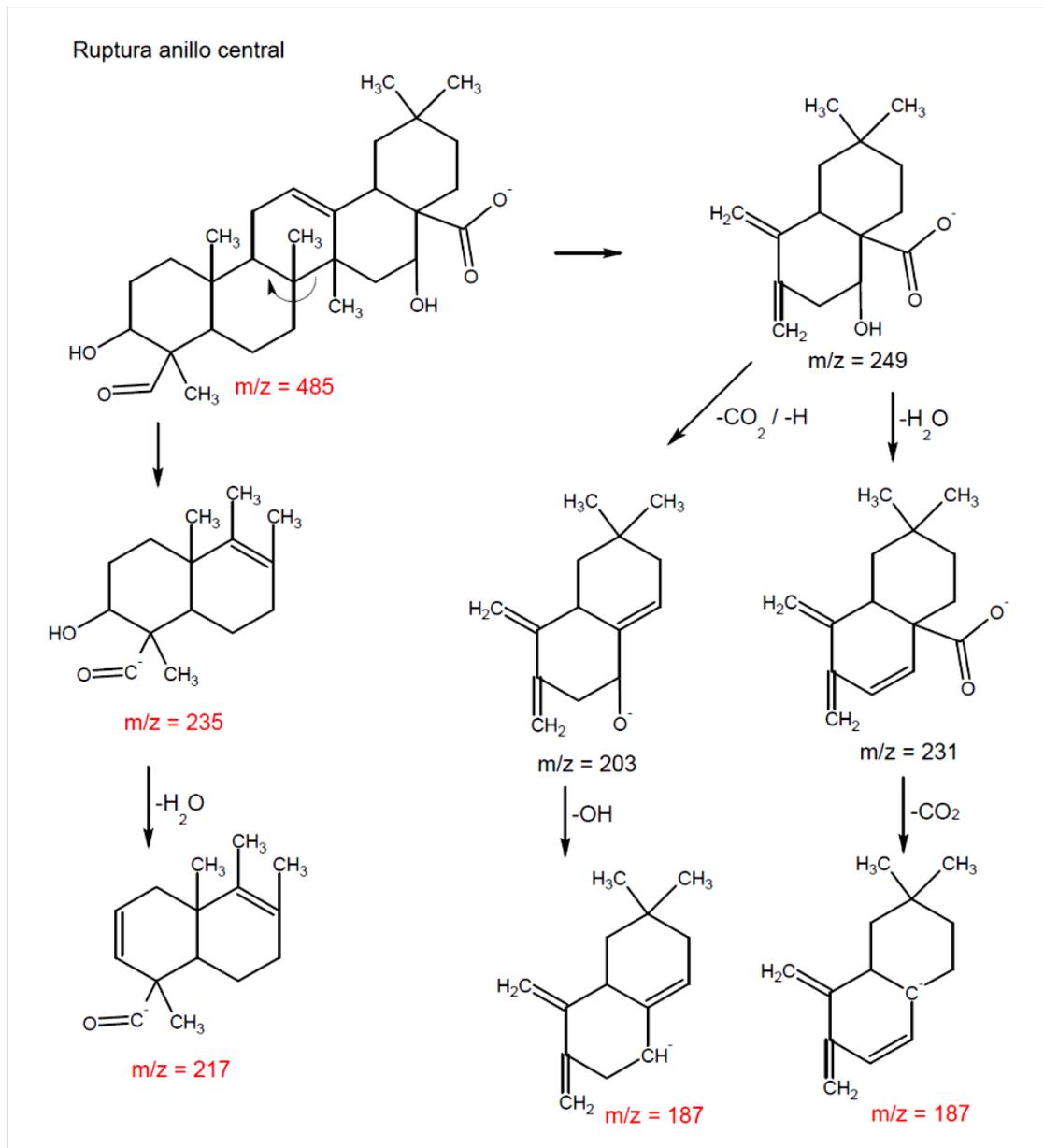


Figura N°11. Otros fragmentos propuestos para retro Diels-Alder para el ácido quillaico



También se propuso una posible fragmentación del núcleo triterpénico pentacíclico mediante la ruptura del anillo central como se señala a continuación en la **Figura N°12**:

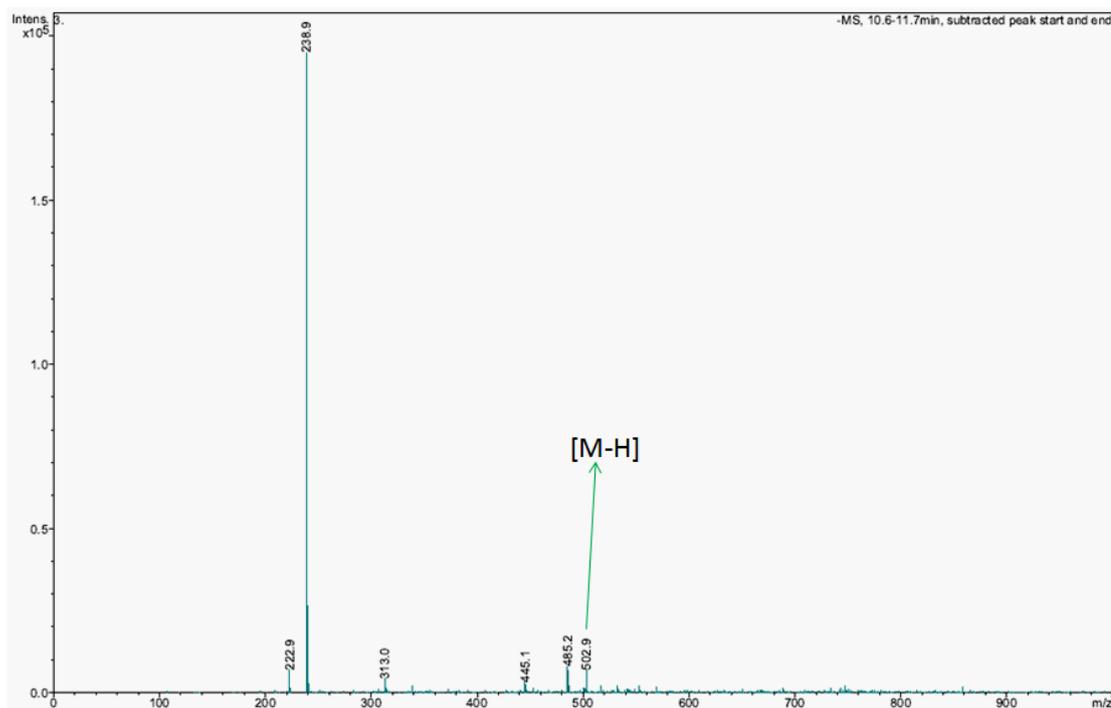
Figura N°12. Fragmentos propuestos por la ruptura del anillo central del ácido quillaico



6.2.2. Propuesta para la arjungenina

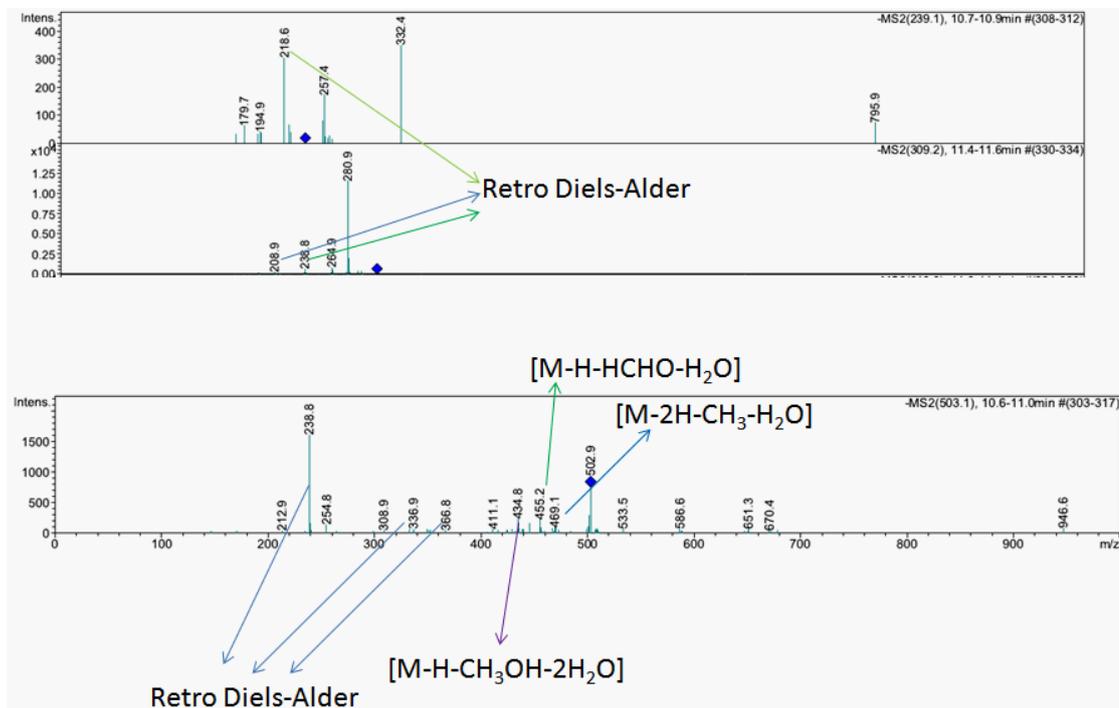
El pico 3 presentó un tiempo de retención de 11 minutos aproximadamente y un ión molecular $[M-H] = 503,1$ para el cual se propuso que correspondería a la arjungenina (PM = 504 g/mol). En la **Figura N°13** se señala el ión molecular para la arjungenina.

Figura N°13. MS¹ para el pico 3



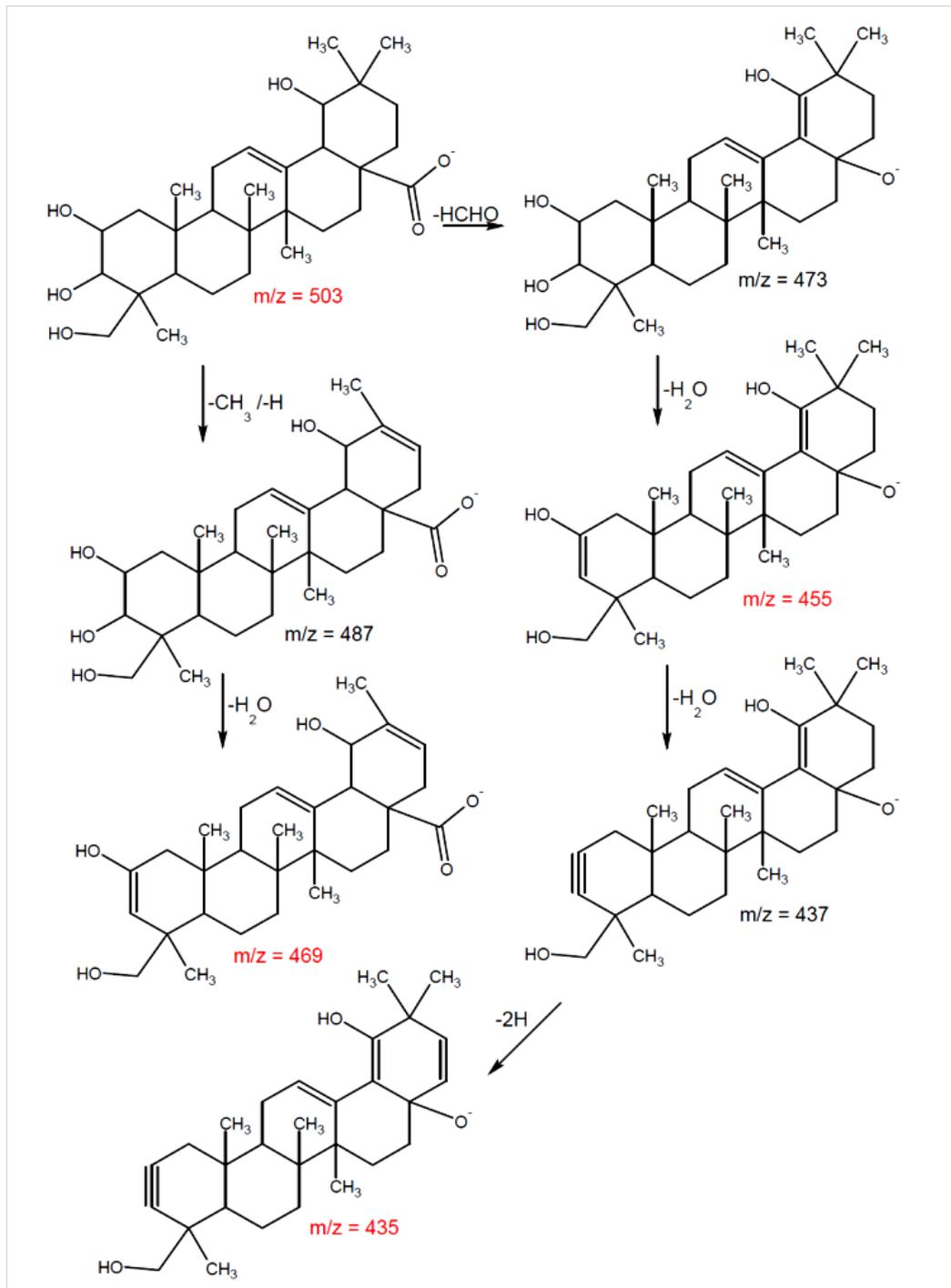
Las principales señales obtenidas son señaladas en la **Figura N°14**:

Figura N°14. Fragmentos propuestos para la arjungenina



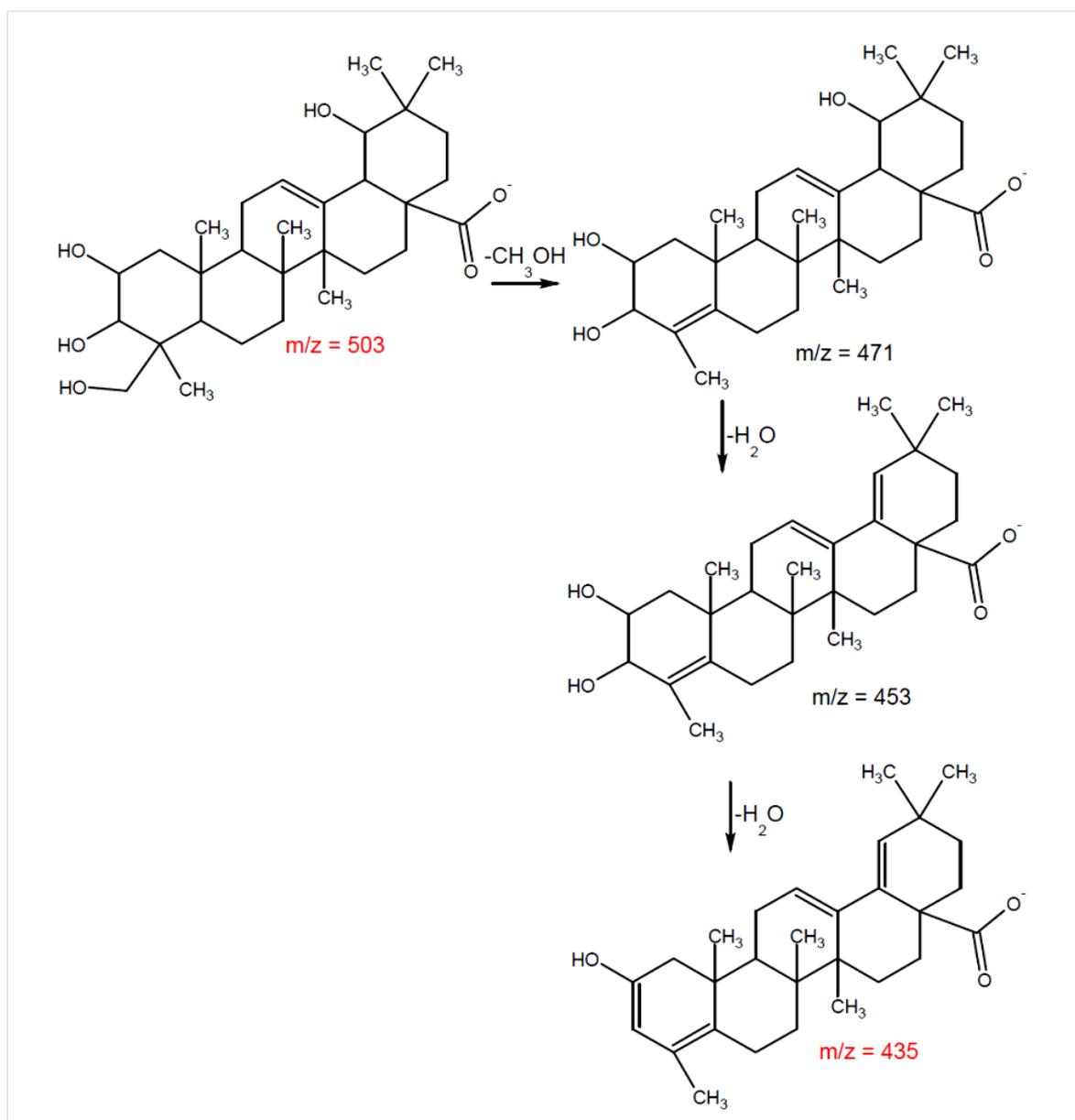
La ruta de fragmentación principal propuesta para la arjungenina y sus respectivos fragmentos son descritos en la **Figura N°15**:

Figura N°15. Ruta de fragmentación propuesta para la arjungenina



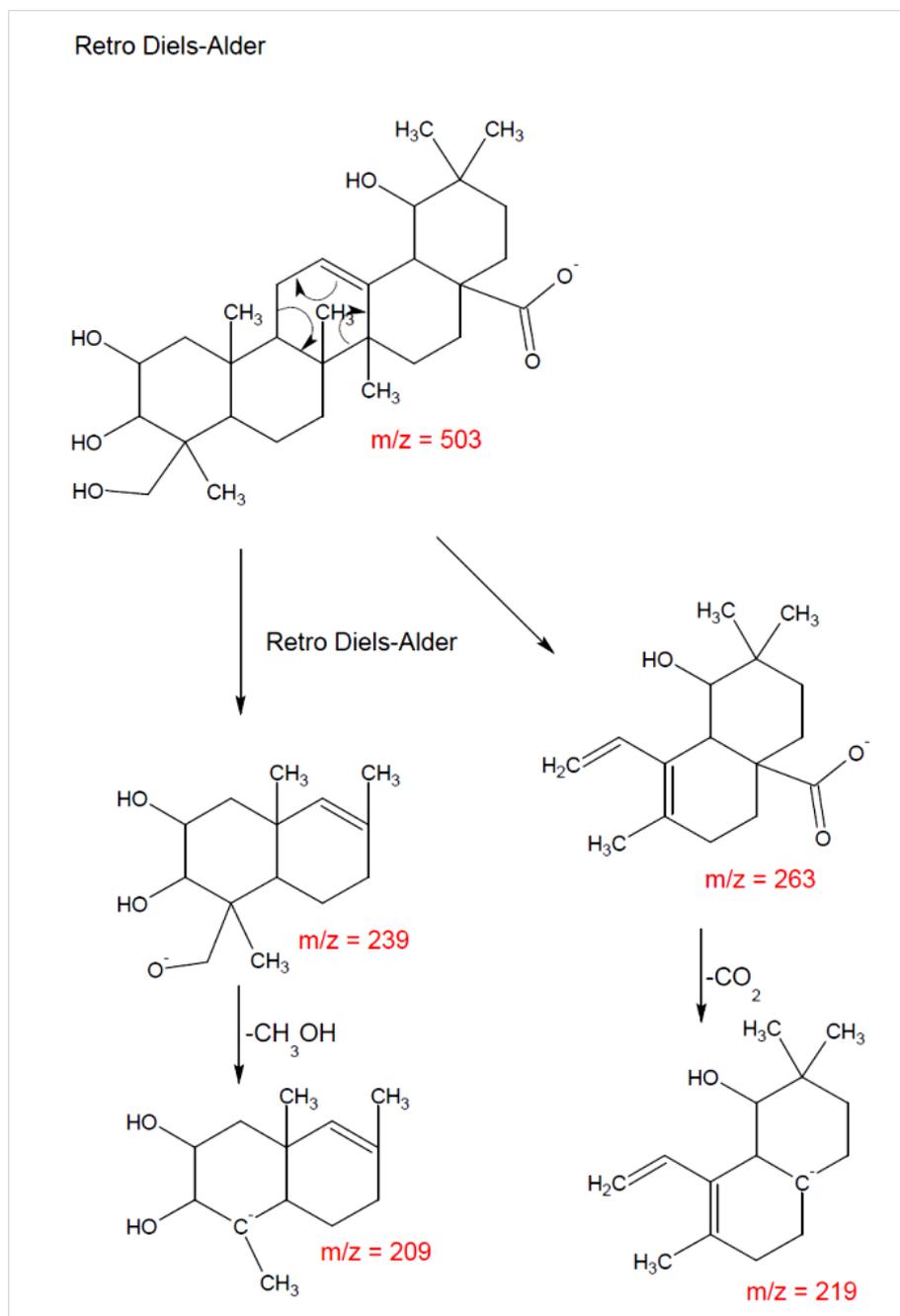
Ahora para los otros fragmentos de menor intensidad se propuso la siguiente ruta de fragmentación (**Figura N°16**):

Figura N°16. Otra posible ruta de fragmentación propuesta para la arjungenina



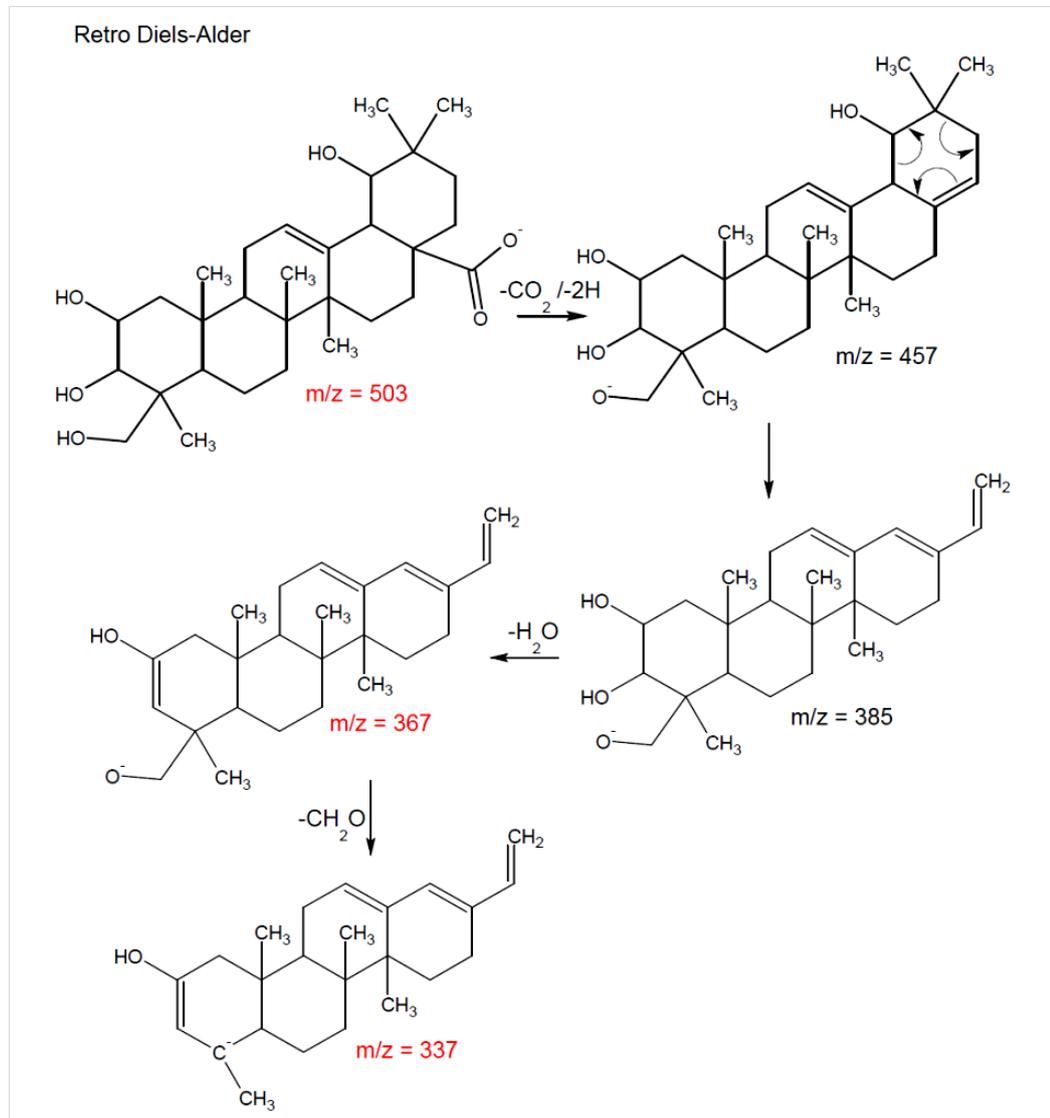
Con respecto a la fragmentación mediante retro Diels-Alder de la arjungenina se propuso la siguiente ruta (**Figura N°17**):

Figura N°17. Fragmentos propuestos para retro Diels-Alder para la arjungenina



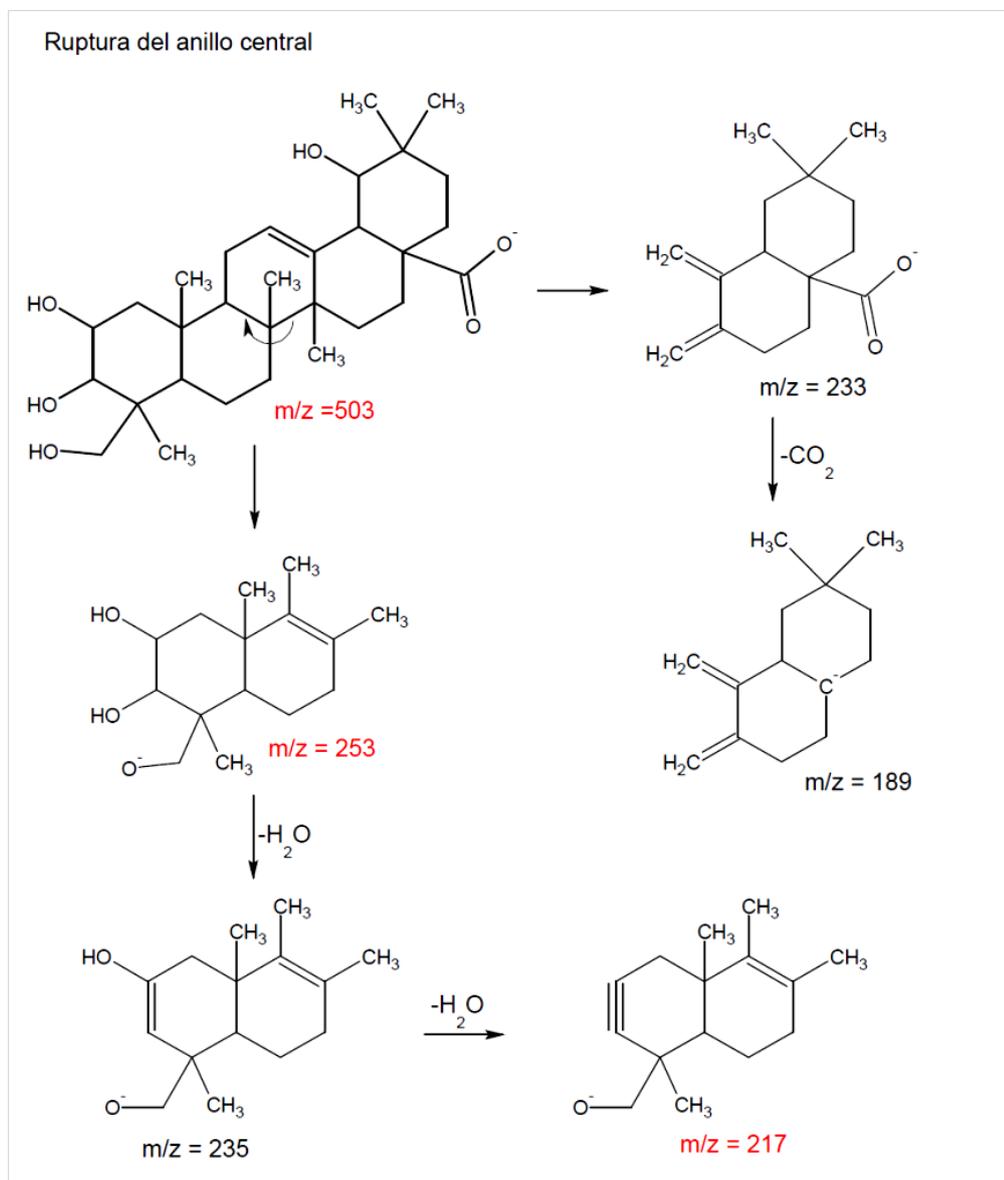
En la **Figura N°17** la señal masa-masa propuesta es de $m/z = 239$ (experimentalmente 238,8) dicha señal corresponde a la de mayor intensidad en el espectro, por lo cual sería la señal característica encontrada para la arjungenina.

Figura N°18. Otros fragmentos propuestos para retro Diels-Alder para la arjungenina



También se postuló una ruta de fragmentación para la arjungenina, a partir de la ruptura del anillo central del núcleo triterpénico, como se presenta en **Figura N°19**:

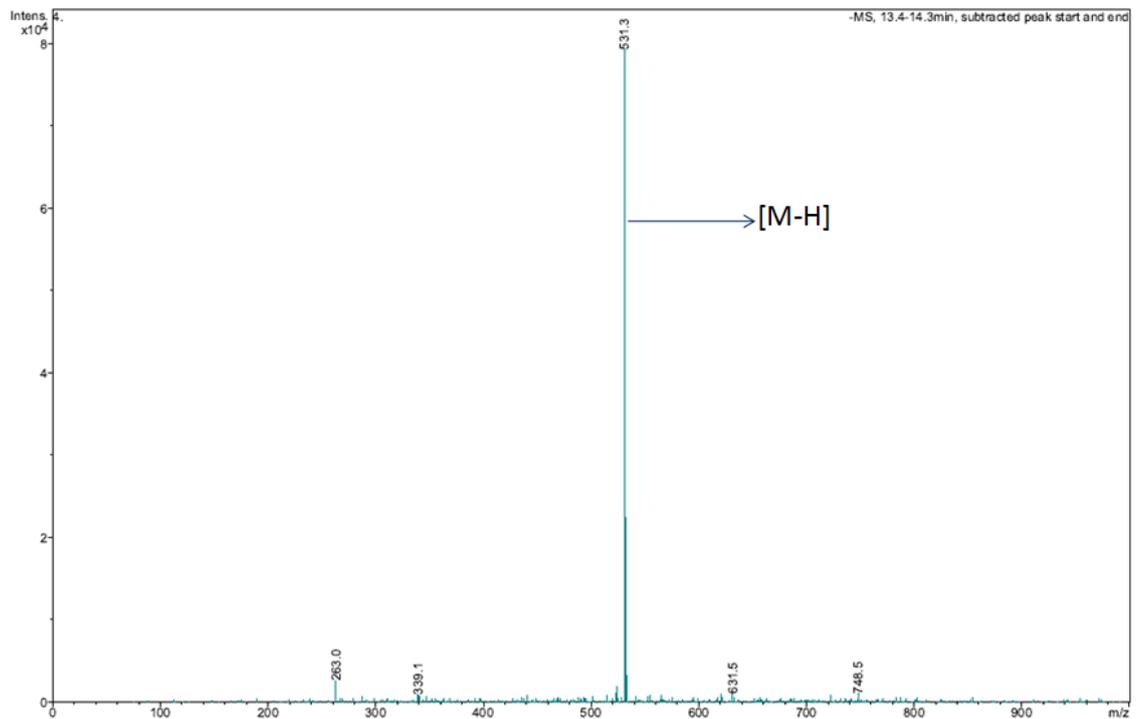
Figura N°19. Fragmentación propuesta para la ruptura del anillo central de la arjungenina



6.2.3. Propuesta para la fitolacagenina

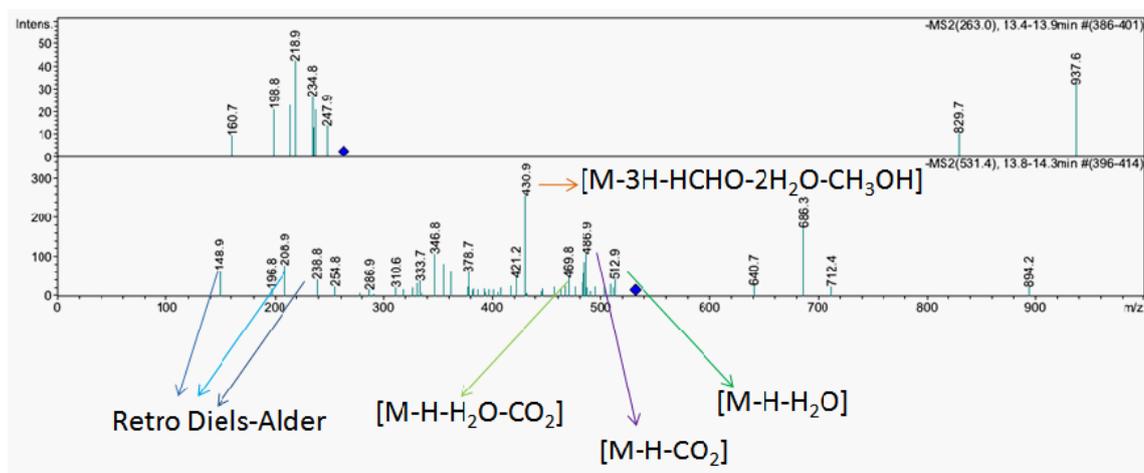
El pico 4 presentó un tiempo de retención de 14 minutos aproximadamente y un ión molecular $[M-H] = 531,2$ para el cual se propuso que correspondería a la fitolacagenina (PM = 532 g/mol). En la **Figura N°20** se señala el ión molecular para la fitolacagenina.

Figura N°20. MS¹ para el pico 4



Las principales señales obtenidas son las siguientes (**Figura N°21**):

Figura N°21. Fragmentos propuestos para la fitolacagenina



Para las señales descritas en la **Figura N°21** la ruta de fragmentación principal propuesta, con sus respectivos fragmentos teóricos y experimentales (en rojo), es la siguiente:

Figura N°22. Ruta de fragmentación propuesta para la fitolacagenina

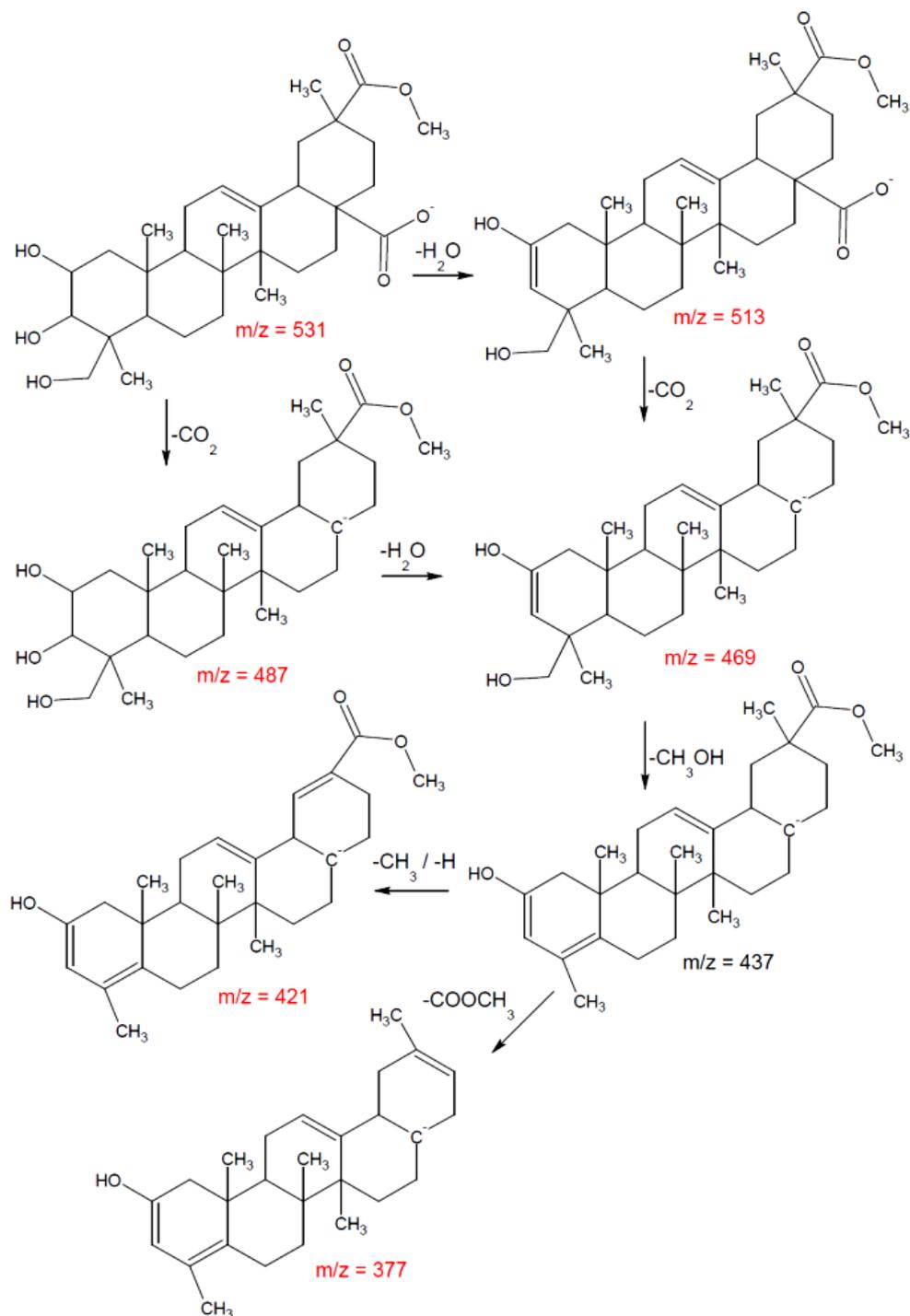
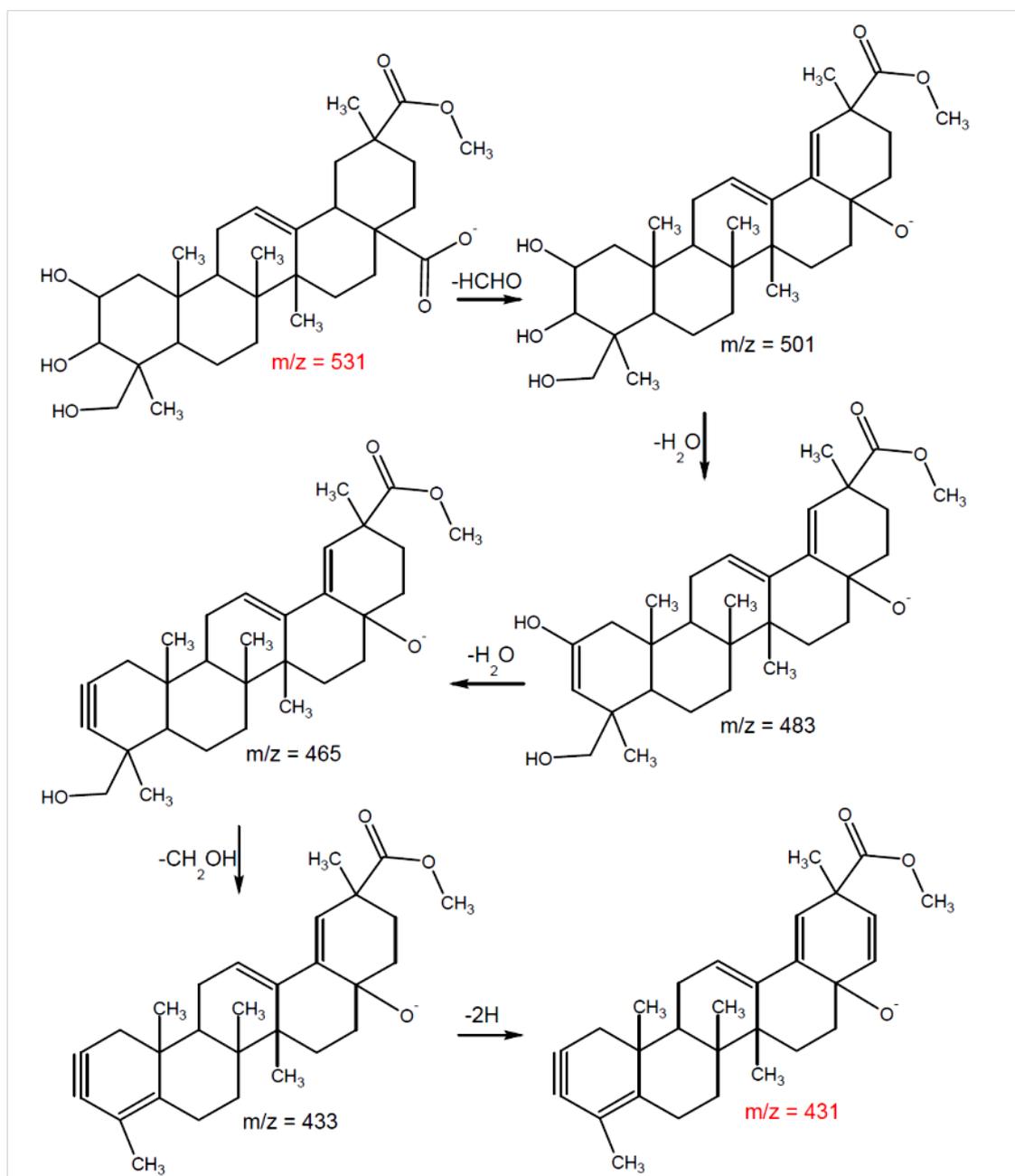


Figura N°23. Otra posible ruta de fragmentación propuesta para la fitolacagenina



De la ruta señalada en la **Figura N°23**, se destaca la presencia del fragmento $m/z = 431$ (experimentalmente 430,9), el cual sería fragmento principal propuestos para la fitolacagenina, dicho fragmento fue el de mayor intensidad.

Con respecto a los fragmentos generados mediante la reacción retro Diels-Alder se propuso la siguiente ruta (**Figura N°24**):

Figura N°24. Fragmentos propuestos por retro Diels-Alder para la fitolacagenina

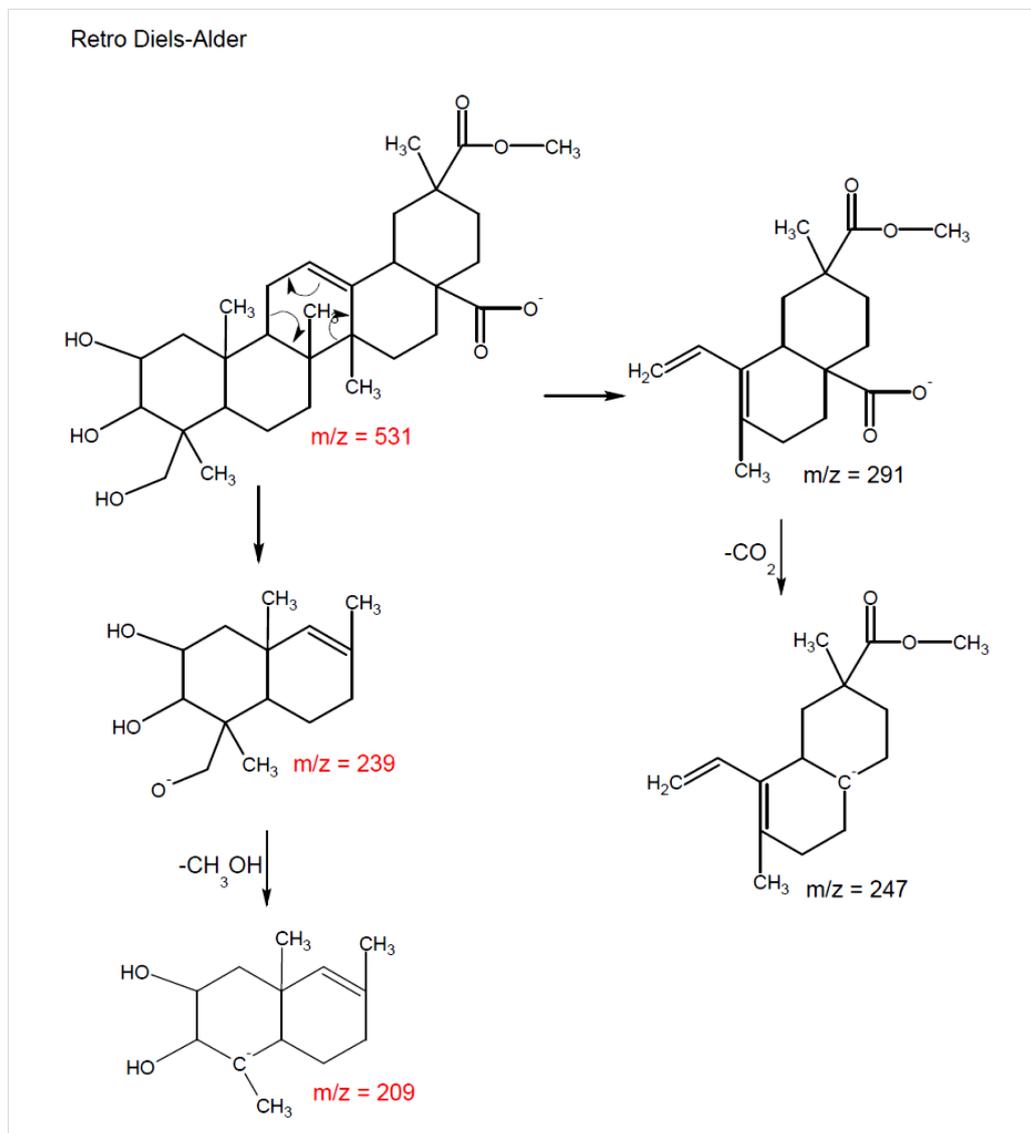
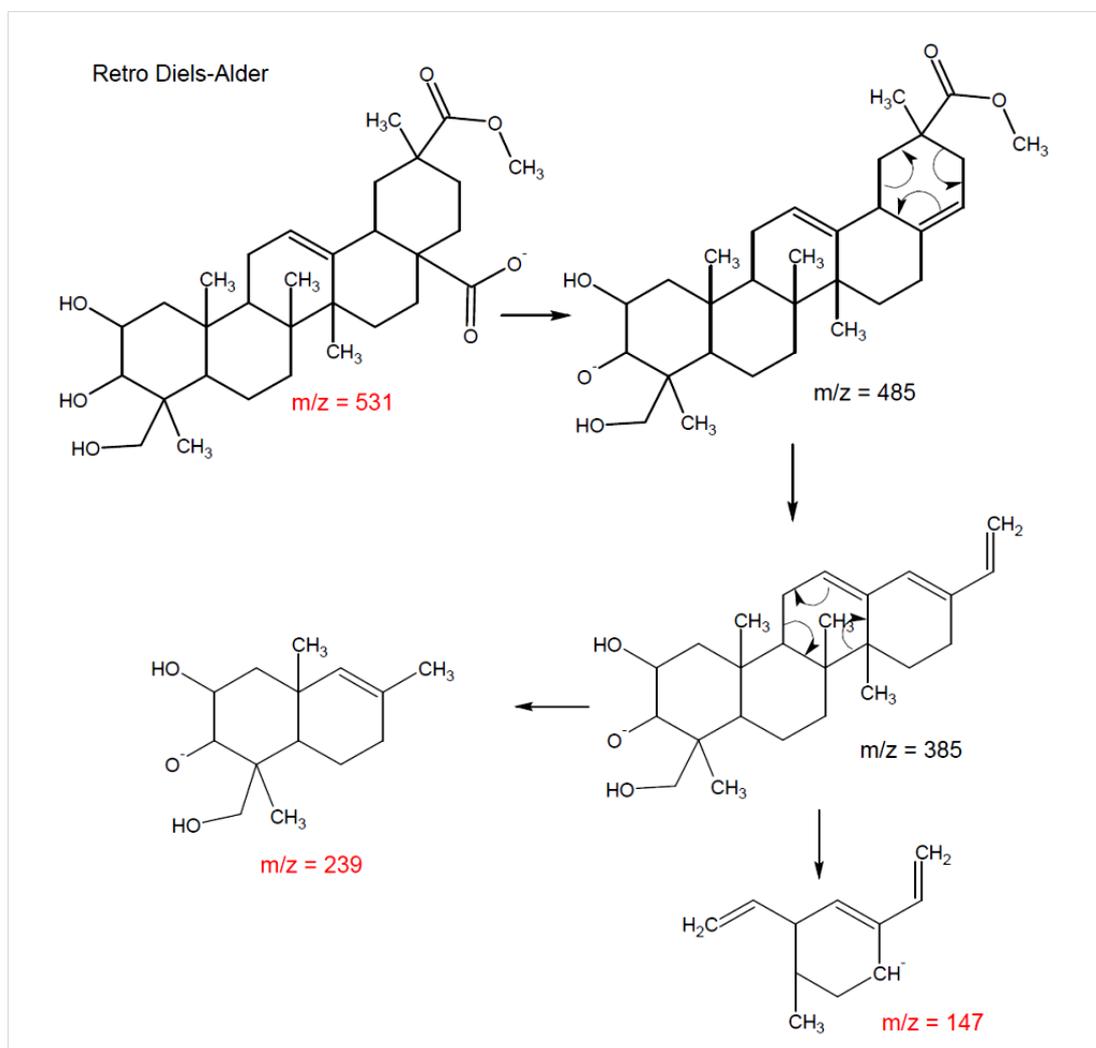
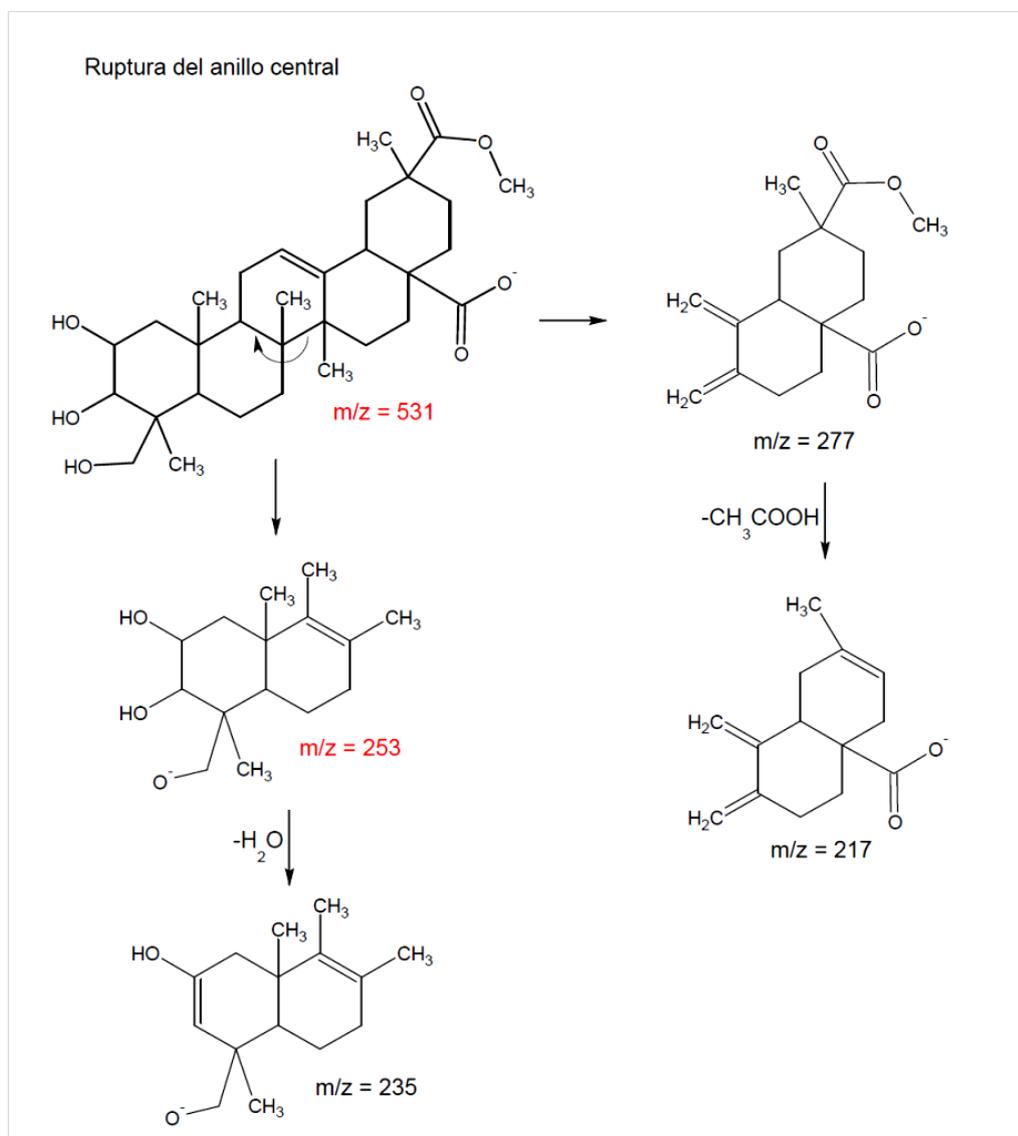


Figura N°25. Otros fragmentos propuestos por retro Diels-Alder para la fitolacagenina



Con respecto a los fragmentos generados por ruptura del anillo central se postuló la siguiente ruta (**Figura N°26**):

Figura N°26. Fragmentación propuesta para la ruptura del anillo central de la fitolacagenina



6.3. Ensayo de inhibición de la enzima glicógeno fosforilasa a (GPa)

Las muestras evaluadas en su capacidad inhibitoria de GPa fueron los grupos Pol-1, Pol-2, Pol-3, Pol-4, Pol-5 y el producto de hidrólisis.

Como primer punto, para el producto de hidrólisis se preparó una solución madre de 2,7 mg/mL, en el caso de precipitar se debe filtrar la muestra antes de colocarla en la microplaca. Cabe destacar que las otras muestras no exhibieron problemas de solubilidad.

Las concentraciones utilizadas y los resultados obtenidos aparecen en la siguiente tabla:

Tabla N°2. Concentración para cada muestra

Muestra	Concentración solución madre (mg/mL)	Concentración solución en microplaca (µg/mL)
Pol-1	2,07	100
Pol-2	1,26	100
Pol-3	1,21	100
Pol-4	1,13	100
Pol-5	1,32	100
Hidrolizado	2.07	100

Tabla N°3. Absorbancia obtenida para cada muestra

N° réplicas	Pol-1 (absor.)	Pol-2 (absor.)	Pol-3 (absor.)	Pol-4 (absor.)	Pol-5 (absor.)	Producto de hidrólisis (absor.)
1	1,179	1,226	1,288	1,155	1,246	1,353
2	1,141	1,264	1,495	1,215	1,224	1,341
3	1,147	1,192	1,107	1,259	1,256	1,481
4	1,146	1,192	1,489	1,208	1,192	1,345
5	1,133	1,170	1,153	1,244	1,231	1,319
6	1,160	1,255	1,182	1,338	1,189	1,393

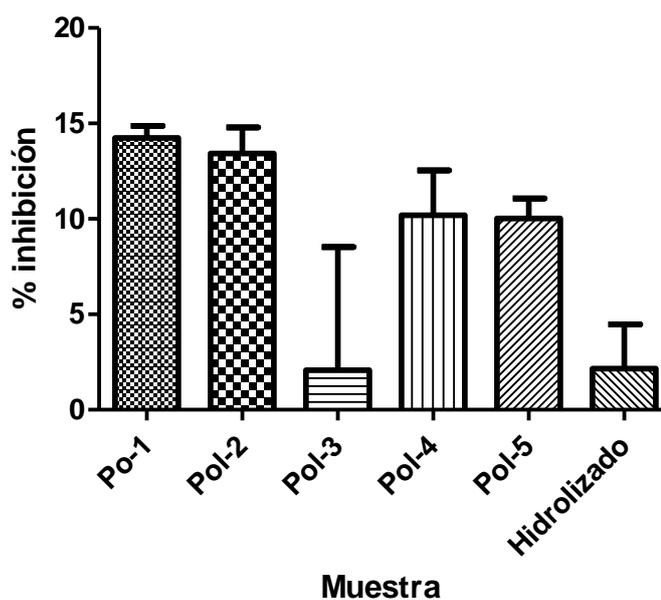
Para graficar los datos obtenidos y su análisis estadístico fué utilizado el programa GraphPad Prism5. Se calculó el porcentaje de inhibición de la muestras sobre la enzima GPa, los cuales son señalados en la **Tabla N°4**:

Tabla N°4. Porcentaje de inhibición para cada muestra

N° réplicas	Pol-1	Pol-2	Pol-3	Pol-4	Pol-5	Hidrolizado
1	11,5	12,6	1,8	17,8	7,9	3,9
2	15,2	9,2	-17,3	12,2	9,9	5,1
3	14,6	15,6	18,6	8,1	7,0	-8,3
4	14,7	15,6	-16,8	12,9	12,9	5,0
5	16,0	17,5	14,4	9,5	9,3	7,2
6	13,4	10,0	11,7	0,7	13,2	0,1
Promedio	14,2	13,4	2,1	10,2	10,0	2,2
Desviación estándar	1,6	3,4	15,8	5,7	2,6	5,6

En la **Figura N°27**, se presenta el porcentaje de inhibición de la GPa de las distintas muestras utilizando el programa GraphPad Prism5:

Figura N°27. % inhibición sobre GPa versus muestra



Los resultados señalados en la **Figura N°27** fueron comparados con el patrón de cafeína el cual a una concentración de 0,05 µg/mL (50 µM) inhibe a la enzima en un $94,42 \pm 1,54$ % (Luo *et al.*, 2008).

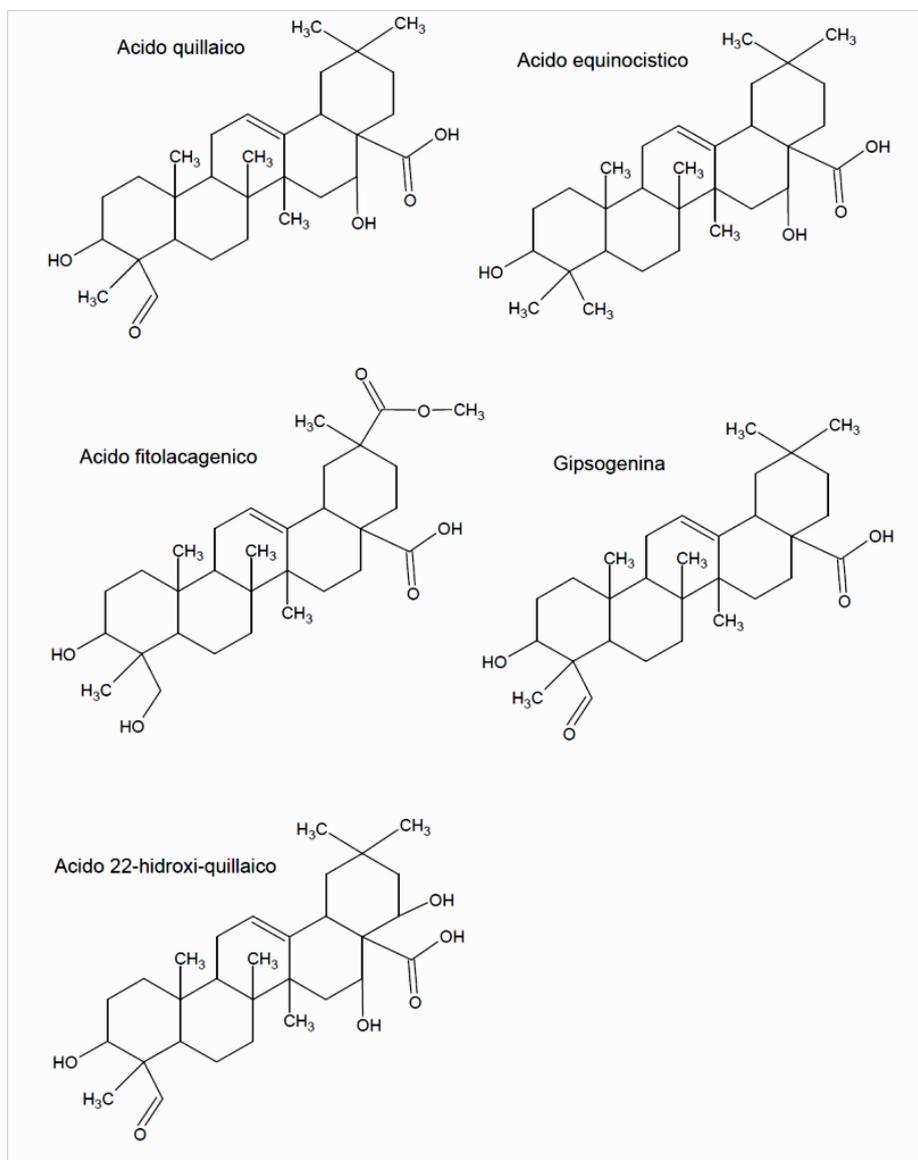
Al comparar los resultados obtenidos con el patrón inferimos que las muestras exhiben un despreciable efecto inhibitorio sobre la enzima glicógeno fosforilasa a, lo cual corrobora los datos obtenidos anteriormente, en el cual se infiere que la sapogenina mayoritaria del quillay, el ácido quillaico, no inhibe a esta enzima (Cartagena, 2010).

VII DISCUSIÓN

7.1. Análisis químico

Como sabemos en el extracto hidrolizado de biomasa de quillay encontramos saponinas tales como ácido quillaico, ácido fitolacagénico, gipsogenina y ácido equinocístico entre otros (Bankefors *et al.*, 2010).

Figura N°28. Saponinas del quillay



El análisis estructural de las geninas presentes en el producto de hidrolisis se hizo con un espectrómetro de masas que ioniza por electrospray, en modo negativo, lo cual quiere decir que los iones generados tendrán carga negativa.

Cabe destacar que la fragmentación en modo positivo (carga positiva) suele ser la más utilizada en otros tipos de ionizaciones, pero para la ionización por electrospray no es de utilidad principalmente porque genera demasiados aductos con sodio y otros cationes, lo cual no permitiría el reconocimiento del ión molecular del compuesto a identificar.

Para nuestro caso, la fracción apolar (pol-1) presentó principalmente ácido quillaico y dos geninas no informadas anteriormente, como es el caso de la fitolacagenina, que se encuentra presente en especies como *Phytolacca americana* (Takahashi *et al.*, 2001) y la arjungenina, que se encuentra en especies como *Terminalia arjuna* (Kalola y Rajani, 2006).

Para el caso de estas tres geninas se encontraron fragmentaciones comunes, las cuales servirían para la futura identificación de otras sapogeninas no informadas anteriormente, tanto en el quillay como en otras especies. Los principales fragmentos propuestos son por pérdida de CO₂ o H₂O (Li *et al.*, 2009), y para otros fragmentos de menor intensidad, se propuso su generación por la pérdida de CH₃, CHO y su consecuente reordenamiento en el grupo carboxilo en el carbono 16 (Chen *et al.*, 2011; Yang *et al.*, 2007).

Para la propuesta de las distintas rutas de fragmentación se tomó en cuenta la reacción de retro Diels-Alder, lo que permitió justificar la presencia de algunos fragmentos de baja intensidad de las 3 sapogeninas estudiadas (Li *et al.*, 2010; Zang y Popovich, 2010).

7.2. Ensayo de inhibición de la enzima glicógeno fosforilasa a

Para el ensayo de inhibición de la enzima GPa a se tomó como compuesto de referencia a la cafeína, el cual a una concentración de 0,05 µg/mL (50 µM) inhibe a la enzima en un 94,42 ± 1,54 % (Luo J. *et al.*, 2008).

Para nuestro caso cada fracción fue evaluada a una concentración de 100 µg/mL, siendo el porcentaje de inhibición menor al 15 %, por lo cual la potencia inhibitoria de los grupos de fracciones obtenidos del extracto acuoso de biomasa de quillay sería baja o nula.

Como la fracciones en la cual se encuentran el ácido quillaico no inhibe fuertemente a la enzima, puede deducirse que el extracto acuoso de biomasa de quillay no sería un inhibidor de la glicógeno fosforilasa a, lo cual se corrobora con los datos de sapogeninas triterpénicas

que sugieren que de esta familia de los oleananos, la genina que inhibiría potentemente a la enzima sería solamente el ácido oleanólico (Wen *et al.*, 2008; Luo *et al.*, 2008).

Con respecto al análisis del procedimiento del ensayo, un problema notorio en la realización de los ensayos fue la difícil disolución de la muestra, ya que al pasar los minutos, muestras como Pol-3 o el hidrolizado presentaban turbidez en la solución.

Este antecedente puede explicar en cierto modo la dispersión de algunos resultados obtenidos

Con respecto al análisis por test de Tukey, no hubo diferencias significativas entre las muestras, por lo tanto los resultados obtenidos pueden ser comparables entre sí.

VIII CONCLUSIONES

- Se optimizó la metodología para la obtención del producto de hidrólisis a partir de un extracto Ultra Dry 100 Q. El rendimiento obtenido fue $40 \pm 2,0$ % del extracto inicial.
- Para la identificación de las geninas presentes en Pol-1 (fracción apolar), mediante CLAE-UV-IES-MS se identificaron tres sapogeninas presentes en esta fracción, las cuales corresponden al ácido quillaico, arjungenina y la fitolacagenina. Estas dos últimas no habían sido descritas para *Quillaja saponaria*.
- Para cada sapogenina se propuso una ruta de fragmentación con fragmentos característicos para cada una de ellas, siendo los fragmentos generados mediante retro Diels-Alder y otros fragmentos generados por pérdida de H₂O, CO₂, HCHO fueron los más fácilmente encontrados en cada espectro.
- La importancia de una ruta de fragmentación común o similar para estos compuestos radica en facilitar la identificación de todos los compuestos englobados en esta familia, como lo son las sapogeninas triterpénicas pentacíclicas.
- Con respecto al ensayo de inhibición de la enzima glicógeno fosforilasa a, se concluyó que tanto el producto de hidrólisis de biomasa de quillay, como los grupos fracciones obtenidos a partir de éste, no actúan como inhibidores de la enzima glicógeno fosforilasa a.

BIBLIOGRAFÍA

- Arrau S., Delporte C., Cartagena C., Rodríguez-Díaz M., González P., Silva X., Cassels B.K., Miranda H.F., “Antinociceptive activity of *Quillaja saponaria* Mol. Saponin extract, quillaic acid and derivatives in mice”, *Journal of Ethnopharmacology*, **2010**, 1-4.
- Barceló A, Aedo C., Rajpathak S., Robles S., “The cost of diabetes in Latin America and the Caribbean”, *Bulletin of the World Health Organization*, **2003**, 81, 19-28.
- Bankefors J., Nord L., Kenne L., “Multidimensional profiling of components in complex mixtures of natural products for metabolic analysis, proof of concept: Application to *Quillaja* saponins”, *Journal of Chromatography B*, **2010**, 878, 471-476.
- Balsevich J., Bishop G., Ramirez-Erosa I., “Analysis of Bisdesmosidic Saponins in *Saponaria vaccaria* L. by HPLC-PAD-MS: Identification of New Quillaic Acid and Gypsogenin 3-O-Trisaccharides”, *Phytochemical Analysis*, **2006**, 17, 414-423.
- Cañigüeral S., Vila R., Wichtl M., “Plantas medicinales y drogas vegetales para infusión y tisana. Un manual de bases científica para farmacéuticos y médicos. 1ª Ed”, Milán, OEMF International, **2001**. 429-430.
- Cartagena C., “Sapogeninas de un extracto de corteza de *Quillaja saponaria* Mol., aislamiento, identificación y evaluación de potencial actividad hipoglicemiante *in-vitro*”, Memoria de título, Santiago, Chile, Universidad de Chile, Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas, **2010**, 84 h.
- Chambery A., Di Maro A., Parente A., “Primary structure and glycan moiety characterization of PD-Ss, type 1 ribosome-inactivating proteins from *Phytolacca dioica* L. seeds, by precursor ion discovery on a Q-TOF mass spectrometer”, *Phytochemistry*, **2008**, 69, 1973-1982.
- Chapagain B., Wiesman Z., Tsrer, “*In vitro* study of the antifungal activity of saponin-rich extracts against prevalent phytopathogenic fungi”, *Industrial Crops and Products*, **2007**, 26, 109–115.
- Chen J., Ye Y., Sun C., Pan Y., “Rapid identification of oleanane-type saponins in the roots of *Stephanotis mucronata* by liquid chromatography/electrospray tandem mass spectrometry”, *Analytica Chimica Acta*, **2008**, 613, 74-82.

- Chen N., Zhang J., Liu J., Yu B., “Microbial conversion of ruscogenin by *Gliocladium deliquescens* NRRL1086: glycosylation at C-1”, Applied Microbiology and Biotechnology, **2010**, 86, 491-497.
- Chen Q., Zhang Y., Zhang W., Chen Z., “Identification and quantification of oleanolic acid and ursolic acid in Chinese herbs by liquid chromatography–ion trap mass spectrometry”, Biomedical Chromatography, **2010**, 25, 1381-1388.
- Donoso C., “Arboles nativos de Chile”, Cuarta Edición, 1989, 60-61.
- Erra-Balsells R., “Del vuelo de las proteínas y de cómo lograrlo”, Revista Química Viva, **2004**, 3, 96-121.
- Guo S., Duan J., Tang Y., Yang N., Qian D., Su S., Shang E., “Characterization of Triterpenic Acids in Fruits of *Ziziphus* Species by HPLC-ELSD-MS”, Journal of Agricultural and Food Chemistry, **2010**, 58, 6285-6289.
- Han L., Pan G., Wang Y., Song X., Gao X., Ma B., Kang L., “Rapid profiling and identification of triterpenoid saponins in crude extracts from *Albizia julibrissin* Durazz. by ultra high-performance liquid chromatography coupled with electrospray ionization quadrupole time-of-flight tandem mass spectrometry”, Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis, **2011**, 55, 996-1009.
- Henry M., “Saponins and phylogeny: Example of the “gypsogenin group” saponins”, Phytochemistry Reviews, **2005**, 4, 89-94.
- A. Hoffmann, “El árbol urbano en Chile”, Tercera Edición, 1998, 196-197.
- Ichikawa M., Ohta S., Komoto N., Ushijima M., Kodera Y., Hayama M., Shirota O., Sekita S., Kuroyanagi M., “Rapid identification of triterpenoid saponins in the roots of *Codonopsis lanceolata* by liquid chromatography–mass spectrometry”, Journal Natural Medical, **2008**, 62, 423-429.
- Jayasinghe L., Hara N., Fujimoto Y., “Bidesmosidic saponins from the fruits of *Diploclisia glaucescens*”, Phytochemistry, **2003**, 62, 563-567.
- Jia Z., Koike K., Nikaido T., “Major Triterpenoid Saponins from *Saponaria officinalis*”, Journal of Natural Products, **1998**, 61, 1368-1373.
- Joh E., Kim D., “A sensitive liquid chromatography–electrospray tandem mass spectrometric method for lancemaside A and its metabolites in plasma and a pharmacokinetic study in mice”, Journal of Chromatography B, **2010**, 878, 1875-1880.

- Jung S., Shin M., Jung J., Kim N., Im K. S., “A Triterpene Glucosyl Ester from the Roots of *Rubus crataegifolius*”, Archives of Pharmacal Research, **2001**, 24, 412-415.
- Kang S., Woo W. S., “Triterpenes from the berries of *Phytolacca americana*”, Natural Products Research Institute, **1980**, 43, 510-513.
- Kalola J., Rajani M., “Extraction and TLC Desitometric Determination of Triterpenoid Acids (Arjungenin, Arjunolic Acid) from *Terminalia arjuna* Stem Bark without Interference of Tannins”, Chromatographia, **2006**, 63, 475-481.
- Kuljanabhagavad T., Wink M., “Biological activities and chemistry of saponins from *Chenopodium quinoa* Willd.”, Phytochemical Review, **2009**, 8, 473-490.
- Labriola R., Deulofeu V., “The structure of prosapogenin from Quillaja saponin”, Departamento de Química Orgánica, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Universidad de Buenos Aires, **1968**, 124-125.
- Lee K., Choi J., Jung W., Nam J., Jung H., Park H., “Structure of a New Echinocystic Acid Bisdesmoside Isolated from *Codonopsis lanceolata* Roots and the Cytotoxic Activity of Prosapogenins”, Journal of Agricultural and Food Chemistry, **2002**, 50, 4190-4193.
- Li E., Luo J., Kong L., “Qualitative and Quantitative Determination of Seven Triterpene Acids in *Eriobotrya japonica* Lindl. by High-performance Liquid Chromatography with Photodiode Array Detection and Mass Spectrometry”, Phytochemical Analysis, **2008**, 20, 338-343.
- Li Y., Wei H., Qi L., Chen J., Ren M., Li P., “Characterization and identification of saponins in *Achyranthes bidentata* by rapid-resolution liquid chromatography with electrospray ionization quadrupole time-of-flight tandem mass spectrometry”, Rapid Communications in Mass Spectrometry, **2010**, 24, 2975-2985.
- Li-qin W., Rong H., Fu-chi Z., Qiu-xiang F., Ye-gao C., “Chemical constituents of *Combretum punctatum* spp. *squamosum*”, Chemistry of Natural Compounds, **2011**, 47, 470-471.
- Liu J., Chen J., Wang C., Qiu M., “New Cucurbitane Triterpenoids and Steroidal Glycoside from *Momordica charantia*”, Molecules, **2009**, 14, 4804-4813.
- Luo J., Liu J., Kong L., “New Pentacyclic Triterpenes from *Gypsophila oldhamiana* and Their Biological Evaluation as Glycogen Phosphorylase Inhibitors”, Chemistry and Biodiversity, **2008**, 5, 751-757.

- Madl T., Sterk H., Mittelbach M., “Tandem Mass Spectrometric Analysis of a Complex Triterpene Saponin Mixture of *Chenopodium quinoa*”, Journal American Society for Mass Spectrometry, **2006**, 17, 795-806.
- Martin W. H., Hoover D. J., Armento S. J., Stock I. A., McPherson R. K., Danley D. E., Stevenson R. W., Barrett E. J., Treadway J. L., “Discovery of a human glycogen phosphorylase inhibitor that lowers blood glucose in vivo”, Proceedings of the National Academy Sciences of the U.S.A., **1998**, 95, 1776 – 1781.
- Palatnik de Sousa C., Santos W., Casas C., Paraguai de Souza E, Tinoco L., da Silva B., Palatnik M, Parente J., “Protective vaccination against murine visceral leishmaniasis using aldehyde-containing *Quillaja saponaria* sapogenins”, Vaccine, **2004**, 22, 2470-2479.
- PDR for Herbal Medicines, first ed. Montvale, N., Medical Economics Company, **1998**, 1079-80.
- Rodríguez-Díaz M., Delporte C., Cartagena C., Cassels B., González P., Silva X., León F., Wessjohann L., “Topical anti-inflammatory activity of quillaic acid from *Quillaja saponaria* Mol. and some derivatives”, Journal of Pharmacy and Pharmacology, **2011**, 63, 718-724.
- Roner M., Sprayberry J., Spinks M., Dhanji S., “Antiviral activity obtained from aqueous extracts of the Chilean soapbark tree (*Quillaja saponaria* Molina)”, The Journal of General Virology, **2007**, 88, 275-85.
- Ronnberg B., Fekadu M., Behboudi S., Kenne L., Morein B., “Effects of carbohydrate modification of *Quillaja saponaria* Molina QH-B fraction on adjuvant activity, cholesterol-binding capacity and toxicity”, Vaccine, **1995**, 15, 17-18.
- Takahashi H., Nanikawa Y., Tanaka M., Fukuyama Y., “Triterpene Glycosides from the Cultures of *Phytolacca Americana*”, Chemical and Pharmaceutical Bulletin, **2001**, 49, 246-248.
- Wen X., Sun H., Liu J., Cheng K., Zhang P., Zhang Li., Hao J., Zhang Lu., Ni P., Zographos S., Leonidas D., Alexacou K., Gimisis T., Hayes J., Oikonomakos N., “Naturally Occurring Pentacyclic Triterpenes as Inhibitors of Glycogen Phosphorylase: Synthesis, Structure-Activity Relationships, and X-ray Crystallographic Studies”, Journal of Medicinal Chemistry, **2008**, 51, 3540-3554.

- Yang M., Wang X., Guan S., Xia J., Sun J., Guo H., Guo D., “Analysis of Triterpenoids in *Ganoderma lucidum* Using Liquid Chromatography Coupled with Electrospray Ionization Mass Spectrometry”, *Journal American Society for Mass Spectrometry*, **2007**, 18, 927-939.
- Zhang W., Popovich D., “Behaviour of soyasapogenol B under optimised hydrolysis and ESI mass spec conditions”, *Food Chemistry*, **2010**, 123, 993-999.

ANEXOS

Anexo 1.1. Quillay



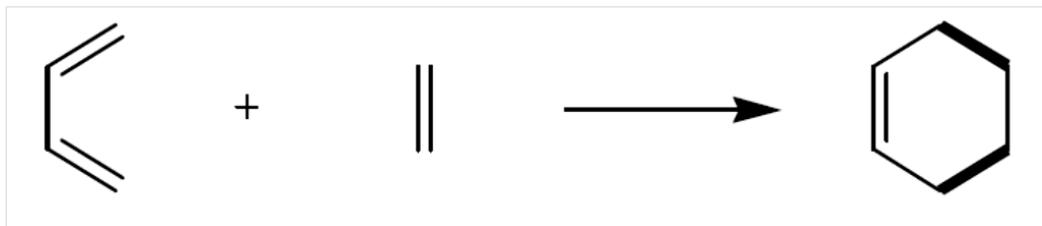
Anexo 1.2. Inflorescencia del quillay



Anexo 1.3. Extracto acuoso seco de biomasa de quillay



Anexo 2.1. Reacción de Diels-Alder



Anexo 3.1. Dianas farmacológicas para la Diabetes Mellitus tipo 2

