



UNIVERSIDAD DE CHILE
FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS Y FARMACÉUTICAS
Departamento de Química Farmacológica y Toxicológica
Laboratorio de Productos Naturales

**ACTIVIDAD INHIBITORIA DE GLICÓGENO FOSFORILASA A
DE LOS EXTRACTOS OBTENIDOS DESDE LAS HOJAS DE
UGNI MOLINAE TURCZ. (MURTILLA) MYRTACEAE.
IDENTIFICACIÓN DE LOS PRINCIPIOS ACTIVOS**

Memoria para optar al Título de Química Farmacéutica

MARÍA JOSÉ QUEUPIL CARRASCO

**Profesora Patrocinante:
Dra. Carla Delporte Vergara**

**Directoras de Memoria
Dra. Lorena García Nannig
Dra. Carla Delporte Vergara**

**SANTIAGO – CHILE
2011**

Hay hombres que luchan un día y son buenos. Hay otros que luchan un año y son mejores. Hay quienes luchan muchos años y son muy buenos. Pero hay unos que luchan toda la vida, esos son los imprescindibles.

Bertolt Brecht

Dedicado a mis padres

Agradecimientos

Quiero agradecer a Dios por todos los bellos momentos que me ha regalado durante mi vida y por todas esas lindas personas que ha puesto en mi camino.

Agradezco a mis padres, Francisco Queupil y María Angélica Carrasco por su amor, apoyo incondicional y por todos los valores que me han entregado, que han llevado a formar la persona que soy. A mis hermanos por su cariño, paciencia y preocupación hacia mí, especialmente a Francisco por acompañarme en cada momento, por tener la palabra precisa en el momento indicado y por ser más que mi hermano, mi amigo.

Agradezco a mis profesoras Dra. Carla Delporte y Dra. Nadine Backhouse por despertar esa inquietud en mí de estudiar los productos naturales. A mis Directoras de memoria por su apoyo, paciencia, disposición, colaboración y valiosas sugerencias. Especialmente agradezco a la Dra. Delporte por su apoyo incondicional antes y durante el desarrollo de esta memoria, su cariño, paciencia y por haber creído en mí.

A mis amigos Daniel Maqueira, Carolina Muñoz, Daniela Ortiz, Jorge Salamanca, Denisse Vásquez, María José Reiman, Angelina Rivas, Gabriela Valenzuela, Claudia Zúñiga, Nidia Zamorano, Carmen Luz Villar y Beatriz Riveros por esas largas noches de estudio, su amistad, cariño y por todos esos gratos momentos vividos que hicieron más ameno mi paso por la escuela.

A la gran familia del Laboratorio de Productos Naturales, entre ellos a David Aravena, Carlos Cartagena, Consuelo Castro, Marcelo Peña, Patricio Torres, Pamela Zapata y Gabriela Valenzuela que me acogieron gratamente desde el primer día y hemos formado lindos lazos de amistad. A Leon Goity por todos los conocimientos entregados, su apoyo y buena disposición en el desarrollo de esta memoria

Financiamiento

Esta memoria fue financiada por el Proyecto FONDECYT N° 1100750 dirigido por la Dra. Carla Delporte Vergara.

TABLA DE CONTENIDOS

ÍNDICE DE FIGURAS	IV
ÍNDICE DE TABLAS	V
ÍNDICE DE ANEXOS	VI
ABREVIATURAS	VII
RESUMEN	X
SUMMARY	XII
Capítulo I Introducción	1
Introducción.....	1
1.1 Glicógeno fosforilasa a y su relación con triterpenos.....	1
1.2 Antecedentes generales de la especie <i>Ugni molinae</i> Turcz.....	3
1.2.1 Clasificación taxonómica.....	3
1.2.2 Distribución geográfica.....	3
1.2.3 Descripción botánica.....	4
1.2.4 Usos de la medicina popular.....	5
1.2.5 Otros usos.....	5
1.2.6 Antecedentes de estudios químicos y farmacológicos.....	6
1.2.6.1 Estudios químicos.....	6
1.2.6.2 Estudios farmacológicos.....	8
Capítulo II Hipótesis	10
Capítulo III Objetivos	11
3.1 Objetivos generales.....	11
3.2 Objetivos específicos.....	11

Capítulo IV Materiales y métodos	12
4.1 Reactivos.....	12
4.2 Material vegetal.....	12
4.3 Estudio químico.....	13
4.3.1 Preparación de los extractos.....	13
4.3.2 Obtención de una fracción rica en triterpenoides.....	13
4.3.2.1 Extracción líquido-líquido.....	13
4.3.2.2 Extracción sólido-líquido (Soxhlet).....	14
4.3.3 Aislamiento de sapogeninas.....	15
4.3.3.1 Fraccionamiento por CC de gel de sílice.....	15
4.3.3.2 Fraccionamiento por CC de Sephadex®LH-20.....	20
4.3.3.3 Placa cromatográfica preparativa (PCP).....	20
4.4 Monitoreo mediante cromatografía en capa fina.....	22
4.5 Determinación de la pureza de U7 y X mediante CLAE.....	23
4.6 Determinación estructural.....	24
4.7 Ensayo de inhibición de la enzima glucógeno fosforilasa a (GPa).....	26
Preparación del Blanco (B).....	27
Preparación del Control Negativo (CN).....	27
Preparación del Blanco muestra o Control no enzimático (CNE).....	27
Evaluación de las muestras (M).....	28
Cálculo del porcentaje de inhibición (%I).....	28
Capítulo V Resultados y discusión	30
5.1 Estudio químico.....	30
5.1.1 Preparación de los extractos.....	30
5.1.2 Obtención de una fracción rica en triterpenoides a partir de EET.....	32
5.1.2.1 Extracción líquido-líquido por partición de solventes.....	32
5.1.2.2 Extracción sólido-líquido (Soxhlet).....	33
5.1.3 Aislamiento de sapogeninas.....	35
5.1.3.1 Fraccionamiento de la F-AcEt mediante CC de gel de sílice (CC MJQ1).....	35

5.1.3.2 Fraccionamiento de la F-AcEt mediante CC de gel de sílice (CC MJQ2).....	37
5.1.3.3 Fraccionamiento de SAE mediante CC de gel de sílice (CC MJQ3).....	38
5.1.3.4 CC Seph 1-4: fraccionamiento de MJQ2 (37-65).....	40
5.1.3.5 Aislamiento de U7 mediante placa cromatográfica preparativa (PCP)..	41
5.1.4 Determinación de la pureza de U7 y X mediante CLAE.....	41
5.1.5 Determinación estructural.....	45
5.2 Evaluación de la actividad inhibitoria de la enzima glicógeno fosforilasa a (GP _a) de los distintos extractos y sub-extractos de <i>Ugni molinae</i>	48
Capítulo VI Conclusiones.....	53
Capítulo VII Referencias bibliográficas.....	54

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura	Página
Figura 01: <i>Ugni molinae</i> Turcz, murtilla	5
Figura 02: Estructura química de los triterpenoides aislados de las hojas de <i>Ugni molinae</i>	7
Figura 03: Esquema de extracción líquido-líquido del EET.....	14
Figura 04: Esquema de extracción Soxhlet.....	15
Figura 05: Esquema de obtención de extractos de <i>Ugni molinae</i> con solventes de polaridad creciente.....	30
Figura 06: Cromatografía en capa fina de los extractos y patrones.....	31
Figura 07: Cromatografía en capa fina de la extracción por partición líquido-líquido del EET.....	32
Figura 08: Esquema y rendimiento de una extracción mediante un equipo Soxhlet para la obtención de una fracción rica en sapogeninas triterpénicas denominada SAE.....	33
Figura 09: Cromatografía en capa fina de la extracción de EET mediante equipo Soxhlet.....	34
Figura 10: Cromatografía en capa fina comparativa de ambas extracciones para la obtención de una fracción rica en sapogeninas triterpénicas.....	35
Figura 11: Resumen de la cromatografía en capa fina de la CC MJQ-1...	36
Figura 12: Cromatografía en capa fina de la CC MJQ-2.....	38
Figura 13: Placa cromatográfica resumen de la CC MJQ-3.....	39
Figura 14: Cromatograma CLAE para U7.....	42
Figura 15: Cromatograma CLAE de la muestra MJQ-1 (12-44), candidata a CLAE-UV-ESI-MS.....	43
Figura 16: Cromatograma CLAE de la muestra MJQ-3 (11-12d).....	44
Figura 17: Estructura química para U7, ácido madecásico.....	47
Figura 18: Curva del % de Inhibición de GPa vs. Log [cafeína].....	49
Figura 19: Efecto inhibitorio sobre la GPa de un extracto estandarizado de <i>C. asiatica</i> , extractos y sub-extractos de <i>Ugni molinae</i>	51

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla		Página
Tabla 01:	Composición y fracciones obtenidas de la CC MJQ-1.....	17
Tabla 02:	Composición y fracciones obtenidas de la CC MJQ-2.....	18
Tabla 03:	Composición y fracciones obtenidas de la CC MJQ-3.....	19
Tabla 04:	Resumen de la obtención de fracciones de la CC MJQ-1.....	36
Tabla 05:	Resumen de la obtención de fracciones de la CC MJQ-2.....	37
Tabla 06:	Resumen de la obtención de fracciones de la CC MJQ-3.....	39
Tabla 07:	CC Seph 1.....	40
Tabla 08:	CC Seph 2.....	40
Tabla 09:	CC Seph 3.....	40
Tabla 10:	CC Seph 4.....	40
Tabla 11:	Tiempo de retención y % de pureza de U7.....	42
Tabla 12:	Tiempo de retención y % de abundancia de los triterpenoides presentes en la muestra MJQ-1 (12-44).....	43
Tabla 13:	Tiempo de retención y % de abundancia de los triterpenoides presentes en la muestra MJQ-3 (11-12d).....	44
Tabla 14:	Señales de RMN- ¹³ C de U7 y datos de la literatura para ácido madecásico.....	46
Tabla 15:	Resultados obtenidos de cafeína frente a GPa.....	48
Tabla 16:	Resultados obtenidos de cafeína frente a GPa ± SD.....	48
Tabla 17:	Resultados de los extractos de <i>U. molinae</i> y <i>Centella asiatica</i> frente a GPa.....	50
Tabla 18:	Efecto inhibitorio sobre GPa de los extractos, sub-extracto de <i>U. molinae</i> y de un extracto estandarizado de <i>C. asiatica</i>	50
Tabla 19:	Prueba de comparaciones múltiples Tukey para el efecto inhibitorio de los extractos de <i>U. molinae</i> y extracto estandarizado de <i>C. asiatica</i> sobre GPa.....	52

ÍNDICE DE ANEXOS

Anexo		Página
Anexo A	Espectro de masa para U7.....	58
Anexo B	Espectro de RMN de U7 aislado de una fracción rica en sapogeninas provenientes de EET.....	59
Anexo B₁	Espectro de ¹ H.....	59
Anexo B₂	Espectro de ¹³ C.....	64
Anexo B₃	Espectro DEPT 135.....	70
Anexo C	Fotografía Testigo herbario <i>Ugni molinae</i> Turcz.....	71
Anexo D	Presentaciones a congresos y jornadas de investigación.....	72

ABREVIATURAS

%I	Porcentaje de inhibición de GPα
μL	Microlitro
A	Absorbancia
AA	Ácido araquidónico
A_B	Promedio de las absorbancias del blanco del control negativo
A_{CN}	Promedio de las absorbancias del control negativo
A_{CNE}	Promedio de las absorbancias del control no enzimático o blanco muestra
AET	Producto de la extracción de EET mediante Soxhlet con agua
A_{muestra}	Absorbancia de la muestra analizada
B	Blanco
C.as	Patrón de <i>Centella asiatica</i>
c.c.f	Cromatografía en capa fina
CC	Columna cromatográfica
CH₂Cl₂	Diclorometano
CLAE	Cromatografía líquida de alta eficiencia
cm	Centímetro
CN	Control negativo
CNE	Control no enzimático
DEPT	Distortionless enhancement by polarization transfer
DMSO	Dimetilsulfóxido
DPPH	Radical 2,2-difenil-1-picrilhidrazilo
EAE	Extracto acetato de etilo
ED₅₀	Concentración que produce un 50% de efecto
EDCM	Extracto diclorometano
EDCM-p	Extracto diclorometano purificado
EET	Extracto etanólico
EHEX	Extracto hexánico
EME	Extracto metanólico
EtOAc	Acetato de etilo

EtOH	Etanol
F-AcEt	Fracción rica en sapogeninas triterpénicas obtenida mediante partición líquido-líquido del EET
F-Aq₁	Fase acuosa de la extracción líquido-líquido proveniente de la solución de EET
g	Gramo
G1P	Solución de glucosa-1-fosfato 2 mM
Gli	Solución de glicógeno 4 mg/mL
GPa	Enzima glicógeno fosforilasa a
HEX	Hexano
IC₅₀	Concentración en la cual se obtiene un 50% de inhibición de la actividad frente a GPa
kg	Kilogramo
M	Muestra
MeOH	Metanol
mg	Milígramo
MHz	Megahertz
min	Minutos
mL	Mililitro
mm	Milímetro
mM	Milimolar
MS	Espectroscopia de masa
n.v	Nombre vulgar
nm	Nanómetro
NP-PEG	Reactivo revelador <i>natural products-polyethylene glicol</i>
PAS	Reactivo revelador p-anisaldehído
PCP	Placa cromatográfica preparativa
PM	Peso molecular
Prom	Promedio
Rf	Factor de retardo
RMN	Resonancia magnética nuclear
RMN-¹³C	Espectroscopia de resonancia magnética nuclear de ¹³ C
RMN-¹H	Espectroscopia de resonancia magnética nuclear de ¹ H

SAE	Producto de la extracción de EET mediante Soxhlet con acetato de etilo
SD	Desviación estándar
SDM	Producto de la extracción de EET mediante Soxhlet con diclorometano
SET	Producto de la extracción de EET mediante Soxhlet con etanol
TPA	12-O-tetradecanoil forbol-13-acetato
U₁	Ácido betulínico
U₂	Ácido oleanólico
U₃	Ácido ursólico
U₄	Ácido alfitólico
U₅	Ácido corosólico
U₆	Ácido asiático
UV	Ultravioleta
v/v	Volumen/Volumen

RESUMEN

Actividad inhibitoria de glicógeno fosforilasa a de extractos obtenidos desde las hojas de *Ugni molinae* Turcz (murtilla) Myrtaceae. Identificación de los principios activos

Murtilla, *Ugni molinae* Turcz, es un arbusto autóctono que crece en forma silvestre y abundante desde la VII hasta la X región, conocida principalmente por sus frutos comestibles. La medicina popular le atribuye diversas propiedades tales como aromática, astringente, estimulante, alivia dolencias de la vía urinaria, entre otras. Sus hojas son utilizadas por la industria dermocosmética como regeneradora de la piel y neutralizadora del estrés oxidativo.

Estudios previos realizados en nuestro laboratorio demostraron que las hojas de esta especie son una rica fuente de triterpenoides pentacíclicos derivados de los núcleos ursano, oleanano y lupano, a los cuales tanto en la literatura como estudios realizados en el laboratorio han establecido que poseen propiedades analgésicas, antiinflamatorias, antioxidantes e hipoglicemiantes. Siendo, esto último de relevancia, pues darían cuenta de propiedades antidiabéticas en las hojas de esta planta

El objetivo de este trabajo fue aislar e identificar principios activos desde hojas de murtilla y ensayar actividad inhibitoria de diferentes extractos sobre la enzima glicógeno fosforilasa.

En el presente trabajo, se utilizaron las hojas de esta especie, las cuales fueron secadas y trituradas para preparar distintos extractos por maceración hasta total agotamiento con solventes de polaridad creciente, obteniéndose los extractos de hexano (HEX), diclorometano (EDCM), acetato de etilo (EAE) y etanol (EET). Este último fue purificado mediante dos técnicas: extracción líquido-líquido y extracción sólido-líquido (Soxhlet) para así obtener una fracción rica en sapogeninas triterpénicas, cuyos productos se denominaron F-AcEt y SAE.

Estas fracciones fueron repurificadas mediante sucesivas columnas cromatográficas de sílica gel y Sephadex® LH-20; y finalmente analizadas mediante placas cromatográficas preparativas para aislar una nueva genina denominada U7 y una mezcla de X y U7. U7 fue aislada e identificada como ácido madecásico (ácido 2, 3, 6, 23 tetrahidroxi-urs-12(13)-eno-28-oico). En tanto que X aún no ha sido completamente identificada. La caracterización de los compuestos se realizó mediante espectroscopia de masa y espectroscopia de resonancia magnética nuclear unidimensional.

El ensayo de inhibición de glicógeno fosforilasa a (GPa) fue realizado midiendo colorimétricamente a 660 nm la liberación del ión fosfato como producto de la reacción enzimática en dirección de la síntesis de glicógeno a partir de glucosa-1-fosfato. Las muestras a evaluar fueron disueltas en DMSO a una concentración de 60 µg/mL. Los resultados demostraron que un extracto estandarizado de *Centella asiatica* y sólo los extractos EAE, EET y sub-extracto SAE poseen actividad, obteniéndose los siguientes resultados de % inhibición frente a GPa \pm SD: 53,8 \pm 4,3; 45,9 \pm 4,3; 92,2 \pm 1,1 y 91,6 \pm 1,2 respectivamente. La actividad de los extractos evaluados podría ser atribuida a los triterpenoides pentacíclicos presentes en estos extractos bioactivos.

En síntesis se contribuyó a ampliar el conocimiento de la composición química de esta especie autóctona y se logró evaluar su efecto sobre GPa, otorgando grandes perspectivas en los estudios químicos-farmacológicos para esta especie nativa.

SUMMARY

Inhibitory activity of glycogen phosphorylase a of extracts obtained from leaves of *Ugni molinae* Turcz (murtilla) Myrtaceae. Identification of the active ingredients.

Murtilla, *Ugni molinae* Turcz is a native shrub that grows wild and abundant from VII to X region and it is known for its edible fruits. Folk medicine attributes to it many properties such as aromatic, astringent, stimulant, relieves ailments of the urinary tract, among others. Its leaves are used by dermocosmetics industry as regeneration of the skin and neutralizing oxidative stress.

Previous studies in our laboratory showed that the leaves of this species are a rich source of pentacyclic triterpenoids derived from the ursane, oleanane and lupane skeletons, to which both the literature and our studies have established that have properties analgesic, inflammatory, antioxidant and hypoglycemic. Being the three latter of relevance since it would be linked antidiabetic properties in the leaves of this plant

The aim of this study was to isolate and identify active ingredients from leaves of murtilla and evaluate their inhibitory activity of different extracts on the glycogen phosphorylase enzyme.

Dry and powdered leaves were used to prepare different extracts by maceration until total exhaustion with solvents of increasing polarity obtaining the hexane (HEX), dichloromethane (EDCM), ethyl acetate (EAE) and ethanol (EET) extracts. The latter was purified by two techniques: liquid-liquid extraction and solid-liquid extraction (Soxhlet) to obtain a fraction rich in triterpene sapogenins, whose products were called F-AcEt and SAE.

These fractions were repurified by successive silica gel and Sephadex LH-20 chromatographic columns, and finally by preparative chromatographic plates, to isolate

a new genin called U7 and a mixture of X and U7. U7 was isolated and identified as madecassic acid (2, 3, 6, 23 tetrahydroxy-urs-12(13)-ene-28-oic acid). While X has not been completely identified. The characterization of the compounds was performed by HPLC-ESI-MSⁿ and ¹H- and ¹³C-NMR .

The inhibition assay of glycogen phosphorylase a (GPa) was determined colorimetrically at 660 nm by measuring the release of phosphate ion as a product of the enzymatic reaction toward the synthesis of glycogen from glucose-1-phosphate. The samples were dissolved in DMSO assessing a final concentration of 60 µg/mL. The results showed that a standardized extract of *Centella asiatica* and only EAE, EET extracts and SAE sub-extract possess activity with a inhibitory effect against GPa ± SD of: 53.8 ± 4.3; 45.9 ± 4.3; 92.2 ± 1.1 and 91.6 ± 1.2 % respectively. The activity of the evaluated extracts could be attributed to the bioactive pentacyclic triterpenoids present in these extracts.

Briefly, this study allowed to increase the knowledge of the chemical composition of *Ugni molinae* leaves and assessing their effect on GPa, releasing great prospects in the chemical and pharmacological studies of this native species

I INTRODUCCIÓN

Desde tiempos inmemorables el hombre ha tratado de mitigar sus dolencias y prolongar su vida. Entre los recursos más aprovechados por las diversas culturas a través de la historia, son los recursos minerales, animales y vegetales. Estos constituyeron hasta mediados del siglo XX los recursos terapéuticos por excelencia.

En la actualidad se estima que alrededor del 80% de la población utiliza medicina alternativa herbolaria (Fitoterapia) como tratamiento paralelo a la medicina tradicional y su uso ha estado siempre muy arraigado a la tradición.

Nuestro país cuenta con una enorme variedad de plantas medicinales autóctonas utilizadas en la medicina folclórica (Muñoz *et al.*, 1981). La murtila (*Ugni molinae* Turcz.) es una planta endémica que crece en forma silvestre en el centro y sur del país. Esta especie es rica en triterpenos pentacíclicos derivados de los núcleos ursano, oleanano y lupano a los cuales tanto en la literatura como estudios realizados en nuestro laboratorio han establecido que posee propiedades antioxidante, antiinflamatoria, analgésica.

1.1 Glicógeno fosforilasa a y su relación con triterpenos

La diabetes mellitus se caracteriza por el aumento crónico de los niveles de glucosa y afecta aproximadamente al 6% de la población occidental adulta (Moller, 2001). Se estima que existirá un aumento del 46% en diez años (Green *et al.*, 2003). Este significativo aumento se espera en países en desarrollo de África, Asia y América del Sur (Diamond, 2003).

La diabetes mellitus se clasifica en dos formas:

- a) Diabetes tipo 1, es una enfermedad autoinmune caracterizada por una deficiencia de insulina y puede ser tratada con insulina exógena.
- b) Diabetes tipo 2, implica una secreción anormal de insulina y/o resistencia a la insulina donde los niveles de glucosa para estos pacientes son controlados

principalmente por dieta, ejercicio e hipoglicemiantes orales y/o administración de insulina.

La regulación de la producción hepática de glucosa a través de la glicogenólisis es un importante blanco para la terapia de la diabetes tipo 2. La glicogenólisis es catalizada en el hígado, músculo y cerebro por isoformas tejido específica de enzimas glicógeno fosforilasa (GP). Numerosos estudios han demostrado que la producción hepática de glucosa es mayor en diabetes mellitus 2 en el estado post-pandrial y se correlaciona directamente con la hiperglicemia en ayunas. La principal enzima reguladora de la glicogenólisis es la GP y sólo la forma fosforilada tiene actividad significativa (GP_a). La GP_a libera glucosa-1-fosfato a partir de glicógeno, el cual juega un papel importante para la glicogenólisis en la producción de glucosa hepática. Por lo tanto la inhibición de la GP_a hepática podría suprimir la producción de glucosa derivada tanto de la glicogenólisis como de la gluconeogénesis (Treadway *et al.*, 2001; Oikonomakos, 2002; McCormack *et al.*, 2001). En vista de los mecanismos expuestos anteriormente la inhibición de GP_a ha sido considerada como una estrategia terapéutica para el control de la glucosa en sangre, varios estudios han demostrado la eficacia de los inhibidores de GP_a en reducir la glicemia en modelos animales de diabetes y ensayos clínicos. Hasta la fecha se han evaluado varias clases estructurales de inhibidores de GP_a, entre ellos los triterpenos pentacíclicos puros, mostrando que la mayoría presenta moderada actividad inhibitoria sobre GP_a (Wen *et al.*, 2005; Wen *et al.*, 2006; Chen *et al.*, 2006; Wen *et al.*, 2008).

1.2 Antecedentes generales de la especie *Ugni molinae* Turcz.

1.2.1 Clasificación taxonómica

Nombre científico: *Ugni molinae* Turcz.

Sinonimias: *Myrtus ugni* Mol.

Eugenia ugni Hook et Arn

Eugenia ugni (Mol.) Hook f

Nombre vulgar: murta, murtilla, mutilla, uñi o ünü (voz mapuche), chilean guava (inglés), chilean cranberry (inglés).

Clase: Magnoliopsida.

División: Magnoliophyta.

Orden: Myrtales.

Familia: Myrtaceae.

1.2.2 Distribución geográfica

En Chile crecen tres especies autóctonas (endémicas) del género *Ugni*:

- *Ugni selkirii* (H.et A) Berg.
- *Ugni molinae* Turcz.
- *Ugni candollei* (Barn.) Berg.

Ugni molinae Turcz crece habitualmente en terrenos despejados, en bordes de ríos, formando parte del matorral. Distribuyéndose ampliamente desde Talca (VII Región) hasta Río Palena (X Región), aunque más ampliamente entre Concepción, Valdivia y Chiloé (Avello y Pastene, 2005). En la parte norte de su área de dispersión habita principalmente en la Cordillera de la Costa formando parte del bosque maulino. Más hacia el sur y hacia el interior del territorio forma parte de la densa formación arbustiva que crece a orillas de los bosques (Hoffmann, 1982; Montenegro, 2000).

En cuanto a sus requerimientos, ésta especie se adapta a suelos marginales, lo que implica terrenos de baja fertilidad, pero de buen drenaje, con un pH de suelo entre 5,6 y 6,0 (Seguel y Avendaño, 2001).

1.2.3 Descripción botánica

Arbusto perenne, muy polimorfo, de tamaño pequeño en condiciones de sequía, aunque en regiones lluviosas puede llegar hasta 2 m de altura (Seguel y Avendaño, 2001)

Posee hojas muy brillantes, verdes en el haz y un poco más claras en el envés. Son pecioladas, opuestas, sin estípulas, de forma aovada-oblonga y con el ápice agudo, de unos 2 a 2,5 cm de longitud. En la cara inferior del limbo foliar se pueden distinguir puntuaciones que corresponden a las glándulas presentes (Montenegro, 2000).

Las flores son de un rosado blanquecino y nacen en las axilas de las hojas. Presentan pedúnculos largos y tienen forma de campana. Son solitarias y hermafroditas. Tienen 5 sépalos, unidos por la base y doblados hacia afuera, formando un cáliz rojo gamosépalo que contrasta con el color pálido de los pétalos. La corola tiene 5 pétalos redondeados que le dan a la flor la apariencia de un capullo. Los estambres son numerosos y de un largo menor que el estilo. Florece entre los meses de noviembre y diciembre (Montenegro, 2000).

Su fruto es una baya rojiza redondeada, que contiene gran cantidad de semillas; es carnoso, dulce, aromático y mantiene los restos del cáliz en su madurez. Se recolecta a mediados de marzo hasta mayo (Hoffmann, 1982; Montenegro, 2000).



Figura 01: *Ugni molinae* Turcz, murtilla.

1.2.4 Usos en la medicina popular

La medicina popular le atribuye propiedades aromáticas, astringentes y estimulantes (Muñoz *et al.*, 1981; Zin y Weiss, 1998). La infusión de sus hojas se emplea para suavizar el cutis reseco y aumentar la elasticidad de la piel (Geldres, 2005) y además la infusión de sus ramas se usa para aliviar dolencias de la vía urinaria (Montenegro, 2000). Los frutos alivian trastornos de la circulación y aumenta la agudeza visual. Además se dice que mascar murtilla fresca cura la estomatitis y aftas (Rozzi, 1984). Las raíces son astringentes y se usan contra la disentería (Zin y Weiss, 1998).

1.2.5 Otros usos

Debido a sus propiedades organolépticas los frutos de murtilla son cosechados en gran cantidad durante el verano, siendo consumidos en su estado fresco o en preparaciones alimentarias tales como dulces, mermeladas, licores y repostería en general (Montenegro, 2000; Muñoz *et al.*, 1981). La murtilla también es utilizada como planta ornamental, ya que es una especie que posee frutos bastante atractivos y sus hojas se mantienen siempre verde (Montenegro, 2000).

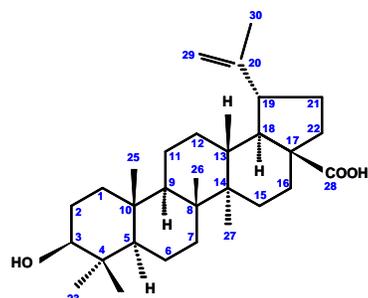
1.2.6 Antecedentes de estudios químicos y farmacológicos

1.2.6.1 Estudios químicos

Posee compuestos polifenólicos como flavonoides, cumarinas, taninos y ácidos fenólicos como ácido gálico y catequina presentes en los extractos acetato de etilo y metanol; además de la presencia de saponinas y esteroides (Avello, 2000; Avello y Pastene, 2003).

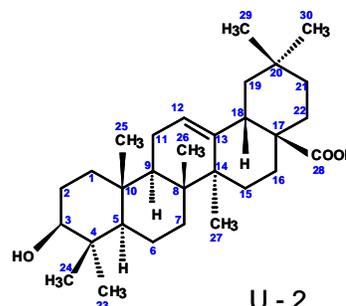
Se han identificado heterósidos de los flavonoles de miricetina, canferol, quercetina, epicatequina y derivados del ácido gálico en extractos acuosos y alcohólicos (obtenidos de etanol o metanol) (Rubilar *et al.*, 2006).

Estudios realizados en nuestro laboratorio permitieron aislar e identificar triterpenos pentacíclicos provenientes de los extractos diclorometano purificado (EDCM-p), acetato de etilo (EAE) y metanólico (EME) tales como: ácido betulínico (U₁), una mezcla de ácido oleanólico (U₂) y ácido ursólico (U₃) en proporción 1:3, ácido alfitólico (U₄), ácido corosólico (U₅) y ácido asiático (U₆) (Aguirre, 2006).

Figura 02: Estructura química de los triterpenos aislados de las hojas de *U. molinae*

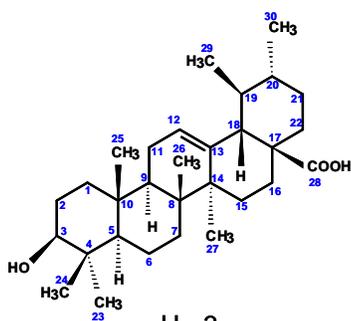
U - 1

Ácido betulínico
Ácido 3 β -hidroxi-20(29)-lupen-28-oico



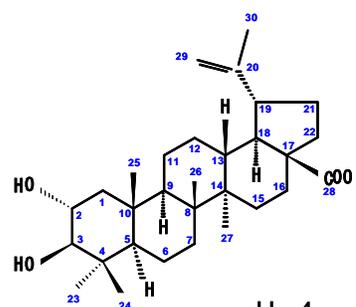
U - 2

Ácido oleanólico
Ácido 3 β -hidroxi-olean-12(13)-en-28-oico



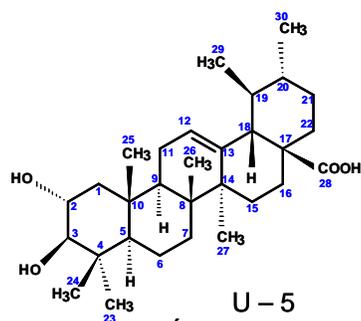
U - 3

Ácido ursólico
Ácido 3 β -hidroxi-urs-12(13)-en-28-oico



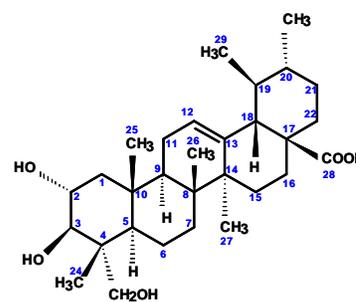
U - 4

Ácido alfitólico
Ácido 2 α -hidroxi-betulínico
Ácido 2 α ,3 β -dihidroxi-20(29)-lupen-28-oico



U - 5

Ácido corosólico
Ácido 2 α -hidroxi-ursólico
Ácido 2 α ,3 β -dihidroxi-urs-12(13)-en-28-oico



U - 6

Ácido asiático
Ácido 2 α ,3 β ,23-trihidroxi-urs-12(13)-en-28-oico

1.2.6.2 Estudios farmacológicos

En nuestro laboratorio se han evaluado diversas actividades farmacológicas, entre ellas la actividad antiinflamatoria de las hojas de *Ugni molinae* en los extractos hexánico (EHEx), diclorometano (EDCM), acetato de etilo (EAE) y metanólico (EME) a dosis de 1 mg/oreja los cuales presentaron efecto antiinflamatorio tópico frente a 12-O-tetradecanoil forbol-13-acetato (TPA) y similar a indometacina (0,5 mg/oreja). El EHEx a dosis de 1 mg/oreja presentó efecto antiinflamatorio frente a ácido araquidónico (AA), superior al observado con nimesulida a igual dosis. De los compuestos aislados para la especie en estudio, ácido alfitólico, ácido corosólico y ácido asiático, presentaron efecto antiinflamatorio tópico dependiente de la dosis frente a la inflamación inducida por TPA. El más activo fue el ácido corosólico con un $ED_{50} = 0,90 \mu\text{mol/oreja}$. Este también fue el único que presentó un fuerte efecto inhibidor del edema inducido por AA (Aguirre *et al.*, 2006)

Delparte *et al.*, 2007 evaluaron la actividad analgésica o efecto antinociceptivo de los distintos extractos de las hojas de *Ugni molinae* (EDCM, EAE y EME) fue evaluado por administración intraperitoneal, oral y tópica comparados con su fármaco de referencia ibuprofeno; mostrando actividad dosis dependiente en todos los ensayos obteniéndose que los extractos EDCM y EAE poseen el mejor efecto antinociceptivo

El efecto antinociceptivo puede estar parcialmente relacionado a la lipooxigenasa y/o ciclooxigenasa de la cascada del ácido araquidónico. Por lo tanto los resultados corroboraron el efecto analgésico de esta especie que la medicina tradicional le atribuye.

La actividad antioxidante fue evaluada mediante el ensayo de decoloración del radical 2,2-difenil-1-picrilhidrazilo (DPPH) y por inhibición de la lipoperoxidación en microsomas hepáticos de rata, pero ninguno de los extractos presentó actividad (Aguirre, 2006). También se evaluó la actividad antioxidante mediante la inhibición de la enzima xantina oxidasa sin dar resultados favorables (Inostroza, 2005).

Lobos (2006) evaluó la actividad cicatrizante del extracto EAE, resultando una buena actividad cicatrizante mediante el aumento significativo en la velocidad de proliferación de los fibroblastos de piel humana *in vitro*, también aumenta el depósito de colágeno tipo I en un efecto dosis dependiente, por lo tanto el EAE usado a una concentración de 5 µg/mL muestra un mayor efecto en la proliferación, migración y depósito de colágeno tipo I en los fibroblastos de la piel humana.

La actividad antimicrobiana, fue evaluada mediante el bioensayo bioautografía, mostrando actividad de los extractos principalmente contra la cepa *Micrococcus flavus*. Ácido asiático es activo contra las cepas *M. flavus*, *B. subtilis* y *E. coli* (Inostroza, 2005). Ácido alifático posee actividad inhibitoria contra *E. coli* y *B. subtilis*. Ácido corosólico posee actividad inhibitoria frente a *Klebsiella pneumoniae* (Peredo, 2008).

Se determinó la efectividad de una formulación cosmética en base a un extracto de las hojas de *Ugni molinae* en el tratamiento de la lipodistrofia (celulitis), para ello se obtuvo por agotamiento con solventes de polaridad creciente el extracto acetato de etilo (EAE) el cual es rico en ácido asiático, dicho extracto fue incorporado en un gel al 1% y testado en voluntarias con piel de naranja y monitoreando mediante inspección visual simple y análisis de imagen 3D, demostrando que el producto aplicado produce una disminución de la piel naranja en las zonas de aplicación del producto significativamente mayor al placebo (Caro, 2009).

II HIPÓTESIS

Los extractos obtenidos desde las hojas de murtila y sus fracciones presentan actividad inhibitoria sobre la glicógeno fosforilasa a (GPa). Esta actividad se debe a la presencia en dichos extractos de triterpenoides pentacíclicos.

III OBJETIVOS

3.1 Objetivo general

- Demostrar que los extractos obtenidos desde hojas de murtila y sus fracciones, con triterpenoides pentacíclicos tienen actividad inhibitoria sobre la GP_a

3.2 Objetivos específicos

- Obtener, purificar e identificar sapogenina(s) triterpénica (s) obtenidas desde un extracto bioactivo.
- Estandarizar la medición de actividad glicógeno fosforilasa a.
- Evaluar la capacidad inhibitoria frente a la GP_a de los diferentes extractos obtenidos desde las hojas de murtila (hexano (HEX), diclorometano (DCM), acetato de etilo (EAE), etanol (EET)).

IV MATERIALES Y MÉTODOS

4.1 Reactivos

Los siguientes reactivos fueron adquiridos de Merck (Darmstadt, Alemania): acetonitrilo y metanol LiChrosolv para CLAE, solventes deuterados, ácido clorhídrico 37%, solventes de grado de laboratorio rectificadas utilizados para realizar las extracciones (hexano, diclorometano, acetato de etilo y etanol), silica gel 60H, cromatofolios de gel de sílice 60F₂₅₄, gel de sílice 60 (70-230 Mesh), molibdato de amonio, verde de malaquita. Columnas de Sephadex® LH-20 (Fluka Sigma, Suiza). El agua desionizada fue preparada usando un sistema Millipore Milli-Q Plus (Millipore, Bedford, MA, USA). Reactivos adquiridos de Sigma-Aldrich (Oakville, ON, USA): sal sódica HEPES (H8651-25G), glicógeno fosforilasa a de músculo de conejo "GPa" (P1261-10MG), -D-glucosa-1-fosfato sal disódica hidratada "G-1-P" (G7018-1G), glicógeno de bovino tipo IX "glicógeno" (G0885-1G), etilenglicol-bis(2-aminoetileter)-N-N'-N'-ácido tetraacético "EGTA" (E3889-10G).

En cuanto a los patrones secundarios ácido betulínico (U₁), ácido oleanólico (U₂), ácido ursólico (U₃), ácido alfitólico (U₄), ácido corosólico (U₅), ácido asiático (U₆) fueron separados y purificados en nuestro laboratorio. Sus estructuras fueron confirmadas previamente mediante RMN-¹H, RMN-¹³C, DEPT; el patrón de *Centella asiatica* (C_{as}) fue obtenido mediante la extracción de sus componentes de un comprimido de Celulase® plus.

4.2 Material vegetal

Las hojas de *Ugni molinae* Turcz, Myrtaceae, n.v. murtila, fueron recolectadas en el mes de abril en la Provincia de Cauquenes, Región del Maule, Chile (35° 41' S; 71° 40' O) e identificadas botánicamente por la Dra. Carla Delporte Vergara, guardándose un testigo en el Herbario de la Escuela de Química y Farmacia (SQF-22462), Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas, Universidad de Chile.

4.3 Estudio químico

4.3.1 Preparación de los extractos

Las hojas secas y trituradas (4,5 kg) fueron sometidas a extracciones sucesivas con disolventes de polaridad creciente (hexano, diclorometano, acetato de etilo y etanol). Cada una de las extracciones fue realizada a temperatura ambiente hasta total agotamiento del material vegetal, llevándolo a sequedad antes de agregar el siguiente disolvente. Los extractos obtenidos fueron respectivamente EHEX, EDCM, EAE y EET; todos fueron concentrados utilizando un evaporador rotatorio Büchi a presión reducida y posteriormente secados en una campana de extracción con una corriente tibia de aire hasta la total eliminación del disolvente.

En esta memoria, se trabajó con el extracto etanólico (EET) debido a que es un extracto no estudiado, es rico en metabolitos secundarios tales como sapogeninas triterpénicas, compuestos fenólicos y saponinas el cual fue tratado mediante dos metodologías para así obtener un crudo rico en sapogeninas triterpénicas.

4.3.2 Obtención de una fracción rica en triterpenoides

Para la obtención de una fracción rica en sapogeninas, el EET fue sometido a dos metodologías distintas:

4.3.2.1 Extracción líquido-líquido

Se pesaron 4 g de EET seco y se agregaron 500 mL de agua destilada, cuya solución fue sometida a ultrasonido durante 15 min en Ultrasonic Cleaner. Posteriormente dicha solución fue llevada a un embudo de decantación en el cual se realizaron 6 extracciones sucesivas con EtOAc de 200 mL cada una. A la fase orgánica reunida se agregó una pequeña cantidad de Na_2SO_4 , posteriormente la solución se filtró en papel Whatman N°4 y nuevamente se agregó Na_2SO_4 . La solución filtrada fue

concentrada a presión reducida hasta que quedará la mínima cantidad de solución y posteriormente fue secada, obteniéndose así una fracción seca rica en sapogeninas triterpénicas denominada F-AcEt (**Fig.03**) la que fue analizada por c.c.f. con los patrones correspondientes (sistema de desarrollo: n-butanol: EtOAc: NH₃: H₂O (6: 4: 0,5: 1) y revelando con p-anisaldehído sulfúrico).

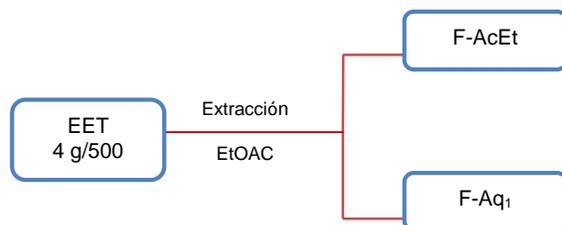


Figura 03: Esquema de extracción líquido-líquido del EET. F-AcEt corresponde a la fracción de EtOAc rica en sapogeninas triterpénicas proveniente del EET. F-Aq₁, corresponde a la fase acuosa de la extracción líquido-líquido, proveniente de la solución de EET.

4.3.2.2 Extracción sólido-líquido (Soxhlet)

La extracción sólido-líquido continua tiene la ventaja de ser mucho más eficiente ya que se realiza con un disolvente caliente en un sistema cerrado. Este tipo de extracción se lleva a cabo en un extractor Soxhlet. Las extracciones fueron realizadas con H₂O, CH₂Cl₂, EtOAc y EtOH hasta total agotamiento. Para dicha extracción se utilizaron 5 g del EET seco el cual fue colocado en un cartucho de celulosa que después será colocado en la cámara de extracción. Una vez preparado todo el montaje del extractor Soxhlet se abre el circuito de refrigeración y se conecta la manta calefactora a nivel 3.

El disolvente del matraz es calentado hasta ebullición, los vapores de éste llegan a través de un conducto lateral al refrigerante, se condensan y caen al fondo de la cámara de extracción. Cuando sube el nivel de disolvente en la cámara de extracción se va mojando el cartucho de celulosa con la muestra. El disolvente en contacto con la muestra extrae los compuestos a fines con él en términos de polaridad y cuando el líquido de la cámara de extracción llega a un determinado nivel éste es forzado a pasar automáticamente por un efecto sifón hacia el matraz inicial, llevando el producto

deseado y la cámara queda de nuevo sin disolvente. El disolvente se vuelve a destilar desde la solución que hay en el matraz y condensa en la cámara, repitiéndose así el proceso de extracción. Cada extracción fue monitoreada mediante c.c.f. Una vez finalizado el proceso de extracción con el primer disolvente, el cartucho de la muestra es sacado de la cámara de extracción y secado para después realizar la extracción con el siguiente disolvente repitiendo todo el proceso anteriormente descrito (**Fig. 04**). Con el fin de obtener una mayor cantidad en g de las fracciones, el proceso se repitió con una nueva cantidad de EET.

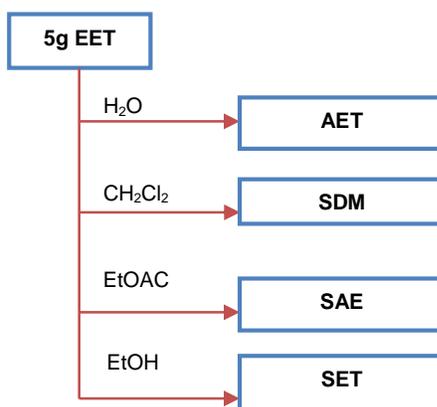


Figura 04. Esquema de extracción por Soxhlet. Donde AET (extracción con H₂O), SDM (extracción con CH₂Cl₂), SAE (extracción con EtOAC) y SET (extracción con EtOH).

4.3.3 Aislamiento de sapogeninas

4.3.3.1 Fraccionamiento por columna cromatográfica (CC) de gel de sílice

La fracción rica en sapogeninas se fraccionó en CC de gel de sílice 60, esta técnica es denominada “cromatografía rápida seca” y tiene como ventaja ser un medio barato y rápido para la separación preparativa de metabolitos secundarios (Still *et al.*, 1978).

La fracción rica en sapogeninas a fraccionar se mezcló con una cantidad igual a su peso en gel de sílice y se homogenizó con ayuda de MeOH en un mortero. Una vez que el disolvente se volatilizó, el sólido se secó en estufa hasta completa sequedad.

A continuación, la muestra se hizo pasar por un tamiz, originando la “cabeza” de la CC.

Por otra parte se pesó una cantidad de gel de sílice que constituyera el “cuerpo” de la CC en una proporción entre 1/50 o 1/100 entre la cabeza de la columna y el cuerpo, para así favorecer el número de platos teóricos que constituyen la CC logrando así una mejor separación de los componentes de la muestra.

El siguiente paso fue seleccionar la columna de vidrio de acuerdo a sus dimensiones, a la cual se agregó un papel filtro sobre la frita y fue conectada a un matraz Kitasato. Posteriormente se mezcló el cuerpo con CH_2Cl_2 (primer solvente que será utilizado para eluir la columna) y se agregó en forma de gel a la columna. Una vez realizado el proceso cuantitativamente, se esperó que el gel de sílice decantara. Una vez ocurrido eso, se incorporó vacío para eliminar completamente el CH_2Cl_2 , compactar el cuerpo y dejar la columna seca.

Luego se agregó un segundo papel filtro, seguido de la cabeza, homogeneizándose con ayuda de presión mecánica y vacío. Una vez que la superficie de la cabeza no presentó irregularidades, se agregó un tercer papel filtro y arena inerte.

Para eluir la primera fracción se activó el sistema de vacío, se agregó un volumen adecuado de fase móvil (500 o 1000 mL) y se cortó el vacío hasta cuando la columna ya no generó más eluyente (**Tabla N°01, 02 y 03**).

Las distintas fracciones obtenidas se monitorearon por medio de c.c.f. (ver más abajo). Aquellas que presentaron un perfil cromatográfico similar se juntaron en una y se concentraron a presión reducida para realizar otra columna de gel de sílice o Sephadex® LH-20.

Características de la CC de gel de sílice MJQ-1

- Muestra: F-AcEt
- Adsorbente: Silica Gel 60 (70-230 Mesh)
- Peso: 3,5 g
- Peso: 355 g
- Dimensiones de la columna (alto*diámetro): 39 cm*5,8 cm
- Cuerpo/Cabeza (cm): 24,5/1 cm
- Cantidad de adsorbente en cabeza: 3,5 g

Tabla N°01: Composición y fracciones obtenidas de la CC MJQ-1

Fracción	Fase móvil	Volumen (mL)
1	CH ₂ Cl ₂ (100)	500
2-6	CH ₂ Cl ₂ :EtOAC (90:10)	1000
7-8	CH ₂ Cl ₂ :EtOAC (80:20)	1000
9-10	CH ₂ Cl ₂ :EtOAC (70:30)	1000
11-16	CH ₂ Cl ₂ :EtOAC (60:40)	1000
17-28	CH ₂ Cl ₂ :EtOAC (50:50)	1000
29-39	CH ₂ Cl ₂ :EtOAC (40:60)	1000
40-42	CH ₂ Cl ₂ :EtOAC (30:70)	1000
43-48	EtOAC (100)	1000

*Nota: las fracciones 12-44 se guardaron, ya que aparecen dos compuestos de interés (ver resultados).

Características de la CC de gel de sílice MJQ-2

- Muestra: F-AcEt
- Adsorbente: Silica Gel 60 (70-230 Mesh)
- Peso: 2,5 g
- Peso: 355 g
- Dimensiones de la columna (alto*diámetro): 39 cm*5,8 cm
- Cuerpo/Cabeza (cm): 24,5/1 cm
- Cantidad de adsorbente en cabeza: 3,5 g

Tabla N°02: Composición y fracciones obtenidas de la CC MJQ-2

Fracción	Fase móvil	Volumen (mL)
1-2	CH ₂ Cl ₂ (100)	1000
3-8	CH ₂ Cl ₂ :EtOAC (90:10)	1000
9-10	CH ₂ Cl ₂ :EtOAC (80:20)	1000
11-14	CH ₂ Cl ₂ :EtOAC (70:30)	1000
15-20	CH ₂ Cl ₂ :EtOAC (60:40)	1000
21-25	CH ₂ Cl ₂ :EtOAC (50:50)	1000
26-33	CH ₂ Cl ₂ :EtOAC (40:60)	1000
34-78	CH ₂ Cl ₂ :EtOAC (30:70)	1000
79-85	CH ₂ Cl ₂ :EtOAC (20:80)	1000
86-90	EtOAC (100)	1000

Características de la CC de gel de sílice MJQ-3

- Muestra: SAE
- Peso: 1,0 g
- Adsorbente: Silica Gel 60 (70-230 Mesh)
- Peso: 75 g
- Dimensiones de la columna (alto*diámetro): 38,5 cm*3,7 cm
- Cuerpo/Cabeza (cm): 16,5/1 cm
- Cantidad de adsorbente en cabeza: 4 g

Tabla N°03: Composición y fracciones obtenidas de la CC MJQ-3

Fracción	Fase móvil	Volumen (mL)
1	CH ₂ Cl ₂ (100)	500
2	CH ₂ Cl ₂ :EtOAC (80:20)	500
3	CH ₂ Cl ₂ :EtOAC (60:40)	500
4-6	CH ₂ Cl ₂ :EtOAC (50:50)	500
7-9	CH ₂ Cl ₂ :EtOAC (40:60)	500
10-11	CH ₂ Cl ₂ :EtOAC (30:70)	500
12a-12e	CH ₂ Cl ₂ :EtOAC (20:80)	500
13-15	EtOAC:MeOH (90:10)	500
16	EtOAC:MeOH (70:30)	500
17	EtOAC:MeOH (50:50)	500
18	EtOAC:MeOH (40:60)	500
19	MeOH (100)	500

4.3.3.2 Fraccionamiento por CC de Sephadex®LH-20

Las fracciones que contenían sapogeninas medianamente purificadas obtenidas en la CC MJQ-2 se disolvieron en una mezcla de disolventes compuesta por HEX: CH₂Cl₂: MeOH en proporciones 6,2: 1,2: 2,7. Para eliminar los sólidos remanentes de la muestra se filtró con papel Whatman N°54, dicho filtrado fue calentado a discreción para así lograr una solución homogénea.

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

Es importante mencionar que el volumen de la muestra a separar depende del volumen de reposo del Sephadex® LH-20 de la columna y del grado de resolución que se desea obtener, pero se recomienda hasta un 2% del volumen de reposo del Sephadex® LH-20. Por lo que, para una columna que tiene una altura de 33,5 cm y un diámetro interno aproximado de 4,6 cm, se debe agregar hasta 20 mL de fase móvil saturada con muestra. La fase móvil utilizada siempre consistió en el mismo sistema de disolventes HEX: CH₂Cl₂: MeOH (6,2: 1,2: 2,7).

Se recolectaron aproximadamente 75 fracciones de eluyente, cada una conteniendo un volumen de 30 mL aproximadamente.

Para monitorear las diferentes fracciones obtenidas de la columna, se utilizaron c.c.f. Bajo este seguimiento, las fracciones que presentaron similar perfil cromatográfico se juntaron en una, se concentraron a presión reducida y se llevaron a sequedad.

4.3.3.3 Placa cromatográfica preparativa (PCP)

El método cromatográfico planar (PCP) es el más antiguo y conocido para la separación de componentes de una muestra, es la técnica de separación más básica y

económica, ya que sólo se requiere de: placas prerrecubiertas o placas obtenidas en el laboratorio de forma artesanal, capilares, cámara de desarrollo, atomizador y horno. Para su preparación se necesitan: 50 g de gel de sílice G60H los cuales son disueltos en 150 mL de agua, formando un gel. Este gel se esparce con ayuda de una varilla en una base vidrio de dimensiones 20 cm*20 cm y un grosor de 1 mm, posteriormente la placa es llevada a una estufa a 100°C durante 2 a 3 horas.

El espesor de adsorbente recomendado para las PCP es entre 0,5-2 mm en placas artesanales (Hostettman *et al.*, 2008)

La aplicación de la muestra es mediante un capilar (Accu-fill90, Micropet 50 µL) a 2 cm de la base de la placa cromatográfica. La elección de la fase móvil utilizada fue determinada mediante pruebas preliminares en c.c.f, llegando a la conclusión de utilizar la fase móvil compuesta por: n-butanol: EtOAc: NH₃: H₂O (5: 4: 0,5: 2).

Una vez sembrada la placa cromatográfica, ésta se colocó en una cámara cromatográfica saturada con fase móvil. Después de eluir los componentes de la muestra, la placa se secó a temperatura ambiente y posteriormente se reveló sólo un sector de ella; para ello la placa se cubre con una lámina de vidrio y se rocía el borde de la placa con el reactivo revelador (p-anisaldehído sulfúrico) y a continuación sólo se somete a calentamiento la zona de revelado hasta la aparición de las manchas correspondientes a los compuestos de interés. Una vez localizadas las distintas manchas, estas son extraídas desde la fase estacionaria una a una, raspando con la ayuda de una espátula en forma cuidadosa la zona correspondiente. Cada mancha es solubilizada en MeOH para su posterior filtrado, operación que se repitió varias veces para así separar el o los compuestos de la fase estacionaria.

De la forma antes descrita, se realizaron repetidas PCP y los filtrados que contenían un compuesto denominado U7 fueron reunidos en uno. Posteriormente los filtrados de U7 fueron sometidos a otro proceso de filtración en una membrana de Millex-GV

(Millipore®) (membrana de PVDF 0,22 μ m). Después de ser filtrados son llevados a sequedad absoluta para ser enviados a análisis mediante CLAE y RMN.

4.4 Monitoreo mediante cromatografía en capa fina

Para el monitoreo de las diferentes fracciones obtenidas de las CC anteriores, se utilizó la técnica de “Cromatografía en capa fina o c.c.f.”, empleándose cromatofolios de silica gel 60 F₂₅₄ donde es sembrada la fracción o muestra a analizar, el cual es introducido en una cámara saturada de un sistema de mezcla de solventes (fase móvil). La fase móvil sube por capilaridad en el cromatofolio arrastrando y separando los distintos componentes de la muestra en función de su polaridad. Una vez que la fase móvil corrió por el cromatofolio hasta antes de 0,5 cm del borde superior del cromatofolio, éste es retirado de la cámara y secado a temperatura ambiente hasta total evaporación de los solventes que constituyen la fase móvil, a continuación es revelado con reactivos reveladores específicos como por ejemplo:

- p-anisaldehído sulfúrico (PAS): éste se preparó de la siguiente forma: p-anisaldehído sulfúrico (0,5 mL de anisaldehído, 10 mL ácido de acético glacial, 85 mL de MeOH y 5 mL de ácido sulfúrico concentrado). El cromatofolio es rociado, secado y calentado a 100°C durante 5-10 min y observado a luz natural. Este reactivo permite detectar triterpenoides, esteroides y saponinas, cuyas coloraciones varían desde azul a violeta. Fueron guardados registros fotográficos de cada una de las c.c.f.
- NP-PEG (*natural products-polyethylene glycol*). La placa es rociada con la solución NP (2-aminoetil difenilborinato al 1% en MeOH) y luego con la solución de PEG (polietilenglicol-4000 al 5% en etanol). Este reactivo revelador permite la detección de fenoles en general (flavonoides, ácidos fenólicos, taninos entre otros). Después de revelar con NP-UV-365 nm los compuestos fenólicos presentan fluorescencia amarilla, anaranjada o rojiza para flavonoides y blanco-azulada para ácidos fenólicos.

Una vez identificadas las manchas correspondientes a los componentes de la muestra, es posible obtener el factor de retardo (Rf) que consiste en el cociente entre la distancia del punto de sembrado de la muestra hasta la mancha del compuesto de interés y la distancia del punto de sembrado hasta el frente de solvente. Esta proporción, junto con la coloración de la mancha y la comparación con una sustancia patrón de referencia, son de gran utilidad para determinar en forma cualitativa frente a qué compuestos encontramos en nuestra muestra.

4.5 Determinación de la pureza de U-7 y X mediante CLAE

Para corroborar la pureza de la fracción obtenida en la CC MJQ-1 y MJQ-3, específicamente la fracciones 12-44 y 11-12e, que según c.c.f. (fase móvil: n-butanol: EtOAc: NH₃: H₂O (6: 4: 0,5: 1)) con el patrón correspondiente y revelando con PAS contiene ácido asiático, un compuesto denominado "X" y U7; la segunda fracción contiene ácido corosólico, asiático, un compuesto denominado "X" y U7.

Se decide utilizar CLAE (cromatografía líquida de alta eficiencia) para determinar la pureza de X y U7 porque es una técnica de alta resolución y permitirá determinar en forma eficiente los componentes presentes en dicha fracción.

De la misma forma se utilizó esta técnica para determinar la pureza de U7 obtenida mediante el aislamiento por PCP, cuya elucidación estructural será mencionada en el punto 6.

El análisis por CLAE de ambos compuestos fue realizado en las siguientes condiciones:

- Columna: C18, LiChroCART® 250 x 4 Purospher® STAR RP-18 (5 µm). Merck.
- Flujo: 0,6 mL/min
- Fase móvil: acetonitrilo: H₃PO₄ al 0,1% en agua = 60: 40 v/v.
- Concentración: 0,8 mg/mL en metanol HPLC.

- Volumen de inyección: 20 μ L.
- Longitud de onda: 201 nm.
- Todos estos análisis fueron desarrollados en un equipo CLAE Waters 600 acoplado a un detector de fotodiodos Waters 996.

Preparación de la muestra: cada muestra a la concentración de 0,8 mg/mL debió sonicarse por 15 min y filtrarse a través de una membrana Gv (Durapore) 0,22 μ m de poro (GVWP01300) en un dispositivo Swinnex® (SX0001300) adquiridos de Millipore Corp., Billerica, MA, USA y acoplado a jeringa de vidrio.

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

Las condiciones anteriores fueron determinadas según Morganti *et al.* (1999); Schaneberg *et al.* (2003); British Pharmacopeia (2001) para triterpenoides de *Centella asiatica* variando la composición y el flujo según las condiciones que se disponen en nuestro laboratorio. Cabe destacar que esta técnica analítica fue validada por el Químico Laboratorista y memorista del Laboratorio de Productos Naturales, Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas, Universidad de Chile (Cava, 2011).

4.6 Determinación estructural

La elucidación estructural del compuesto aislado (U7) de las hojas de *Ugni molinae* proveniente del EET fue realizada mediante análisis de los espectros de RMN de una dimensión (RMN-¹H, RMN-¹³C, DEPT-135) y por CLAE-UV-ESI-EM, empleando como disolventes CD₃OD.

- a. Preparación de la muestra para RMN de una dimensión: los mg de U7 obtenidos en el punto 3.3 fueron colocados en un tubo para RMN, se agregó 0,6 mL de solvente deuterado (CD₃OD), se agita la solución para homogeneizar, teniendo la precaución de que la solución resultante no posea

partículas en suspensión, en el caso que hubiese suspensión se debe filtrar la solución a través de un algodón, previamente desengrasado con éter de petróleo y seco. Es importante destacar que el volumen de solución en el tubo debe ser entre 0,6-0,7 mL, ya que una cantidad inapropiada influye en la homogeneización del campo a través de la muestra y origina pérdida de sensibilidad (menor relación señal/ruido) y deteriora la calidad del espectro.

- b. Preparación de muestra para CLAE-UV-ESI-EM: La muestra se preparó a concentración de 3 mg/mL en MeOH.
- Obtención de cromatogramas/adquisición de espectros: las muestras se examinaron en un sistema CLAE-UV-ESI-MS que consistió del sistema CLAE Agilent 1100 (Agilent Technologies Inc.) acoplado al espectrómetro de masas de tipo electrospray-trampa iónica ESI-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 de masas se utilizó el programa esquireControl 5.2 (Bruker Daltonik GmbH, Alemania).
 - Para la separación CLAE se utilizó una columna Purospher RP18 de 250×4.6 mm, 5 µm y 100 Å (Merck KGaA, Alemania), 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 cada muestra se realizó a temperatura ambiente utilizando la fase móvil ácido fórmico 0,1% v/v: acetonitrilo (40:60) mediante un programa isocrático a un flujo de 0,6 mL/min y registro UV a 201 y 310 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 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 min.

- Análisis de cromatogramas y espectros/Identificación de señales: El análisis de cromatogramas y espectros de masas se realizó por medio del programa DataAnalysis 3.2 (Bruker Daltonik GmbH, Alemania).

4.7 Ensayo de inhibición de la enzima glicógeno fosforilasa a (GPa)

Este ensayo *in-vitro* se basa en la medición colorimétrica que detecta la liberación de ión fosfato, basado en el método modificado de Martin *et al.* (1998). La actividad de GPa se medirá en dirección de la síntesis de glicógeno por liberación de fosfato desde glucosa-1-fosfato. La enzima se agregará a un volumen total de 100 μ L de tampón que contendrá HEPES 50 mM (pH 7,2), KCl 100 mM, MgCl₂ 2,5 mM, EGTA 2,5 mM, glucosa-1-fosfato 0,5 mM y glicógeno 1 mg/mL y la muestra disuelta previamente en DMSO. Se medirá la absorbancia a 660 nm en lector de microplaca Biotek ELx 800, luego de 5 min de la adición de 150 μ L de solución de detención que consiste en HCl 1 M conteniendo molibdato de amonio 10 mg/mL y verde de malaquita 0,38 mg/mL posterior a un tiempo de reacción de 25 min a 22 °C, Wen *et al.* (2008).

Los datos se analizaron según el programa GraphPad Prism 5. Por test ANOVA de una vía, con post-test Tukey, considerando como diferencia significativa al p 0,05. Las determinaciones se realizaron en sextuplicado o septuplicado.

La secuencia de las operaciones realizadas, considerando blanco, control negativo, blanco muestra o control no enzimático y las muestras, se puede describir de la siguiente forma:

Preparación del Blanco (B):

El blanco se prepara adicionando en el siguiente orden 40 μL de solución tampón más sales pH 7,2, 60 μL de HEPES pH 7,2, 10 μL de DMSO y 150 μL de solución de detención.

Preparación del control negativo (CN):

Se preparó un volumen de solución enzimática de 40 $\mu\text{g/mL}$ suficiente para la evaluación de todas las muestras deseadas. Teniendo en cuenta una alícuota de 10 μL por cada réplica.

Se procedió en cada determinación de la siguiente forma: a cada pocillo de la microplaca se adicionó 40 μL de solución tampón más sales pH 7,2, 10 μL de DMSO, 25 μL de Gli, se homogenizó la placa con pequeños golpecitos, se agregó 25 μL de G1P, y la reacción se comienza agregando 10 μL de GPa 40 $\mu\text{g/mL}$, se cronometró 25 min, se adicionó 150 μL de solución de detención, se esperó 5 minutos y se leyó en el lector de microplaca.

Preparación del Blanco muestra o Control no enzimático (CNE)

Se procedió en cada determinación de la siguiente forma: a cada pocillo de la microplaca se adicionó 40 μL de solución tampón más sales pH 7,2, 10 μL HEPES pH 7,2, 10 μL de solución de muestra, 25 μL de Gli, se homogenizó la placa con pequeños golpecitos, se agregó 25 μL de G1P, y 150 μL de solución de detención, se esperó 5 minutos y se leyó en el lector de microplaca.

Evaluación de las muestras

Se procedió en cada determinación de la siguiente forma: a cada pocillo de la microplaca se adicionó 40 μ L de solución tampón más sales pH 7,2, 10 μ L de solución de muestra, 25 μ L de Gli, se homogenizó la placa con pequeños golpecitos, se agregó 25 μ L de G1P, y la reacción se comienza agregando 10 μ L de GPa 40 μ g/mL, se cronometró 25 min, se adicionó 150 μ L de solución de detención, se esperó 5 minutos y se leyó en el lector de microplaca.

Bajo este protocolo se evaluaron los extractos, fracciones ricas en triterpenos y la cafeína, que corresponde al fármaco utilizado como referencia para esta enzima (Martin *et al.*, 1998; Wen *et al.*, 2008; Chen *et al.*, 2006).

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, 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_B) el cual corresponde a la absorbancia que otorga el lector de microplaca frente al medio de detención.

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} : Promedio de las absorbancias del control negativo.
- A_B : Promedio de las absorbancias del blanco del control negativo.
- $A_{muestra}$: Absorbancia de la muestra analizada.
- A_{CNE} : Promedio de las absorbancias del control no enzimático o blanco muestra.

V RESULTADOS Y DISCUSIÓN

5.1 Estudio químico

5.1.1 Obtención de los extractos

De la extracción de las hojas secas y trituradas de *Ugni molinae* con solventes de polaridad creciente, se obtuvieron diversos extractos. En esta memoria fue investigado desde el punto de vista químico el extracto etanólico (EET) con un 22,2% de rendimiento como se indica en la **Fig. 05**.

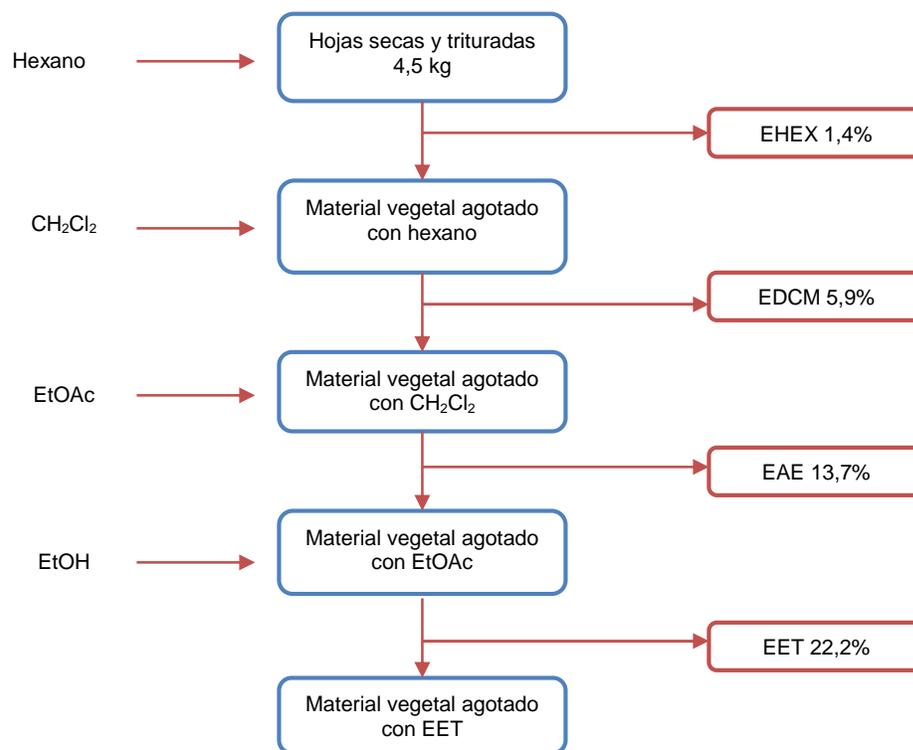


Fig. 05: Esquema de obtención de extractos de *Ugni molinae* con solventes de polaridad creciente. EHEX: Extracto hexánico; EDCM: Extracto diclorometano; EAE: Extracto acetato de etilo; EET: Extracto etanólico.

El estudio en c.c.f. de los extractos fue realizado empleando como sistema de solventes n-butanol: EtOAc: NH₃: H₂O (6: 4: 0,5: 1) y revelando con PAS el cual muestra que el EET es rico en triterpenoides, esteroides y/o saponinas tal como se indica en la **Fig. 06**.

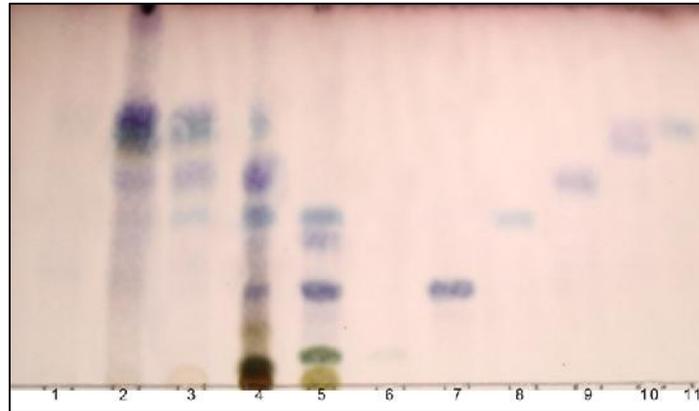


Fig. 06: Cromatografía en capa fina de los extractos y patrones. 1: EHEX; 2: EDCM; 3: EAE; 4: EET; 5: Extracto *C. asiatica*; 6: Asiaticósido; 7: Ácido madecásico; 8: Ácido asiático; 9: Ácido corosólico; 10: Mezcla de ácidos alfitólico y corosólico; 11: Ácido oleanólico. Fase móvil: n-butanol: EtOAc: NH₃: H₂O=6:4:0,5:1. Reactivo revelador PAS.

5.1.2 Obtención de una fracción rica en triterpenos a partir de EET

5.1.2.1 Extracción líquido-líquido por partición de solventes

Después de 6 extracciones sucesivas de la solución acuosa de EET (0,8%) con EtOAc, descritas en el punto 4.3.2.1 del Capítulo Materiales y Métodos, se obtuvo con un rendimiento del 25% la fracción final seca rica en sapogeninas triterpénicas denominada F-AcEt.

Al observar la **Fig. 07** se puede apreciar la presencia de un nuevo compuesto con R_f coincidente al patrón de ácido madecásico que aparece muy tenue en la c.c.f. del EET, pero que se acentuó en la F-AcEt, debido a que es una fracción más purificada.

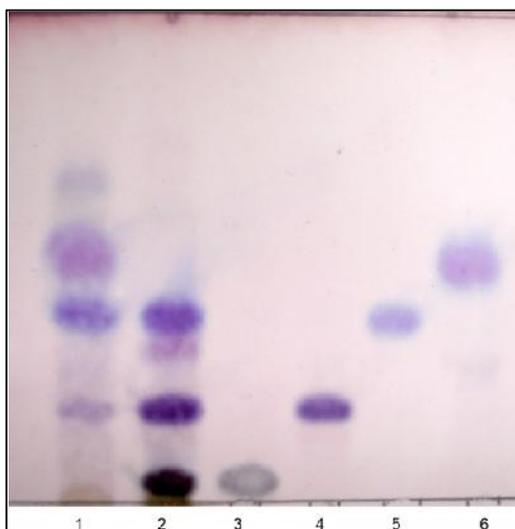


Fig. 07: Cromatografía en capa fina de la extracción por partición líquido-líquido del EET.
1: F-AcEt; 2: Extracto *C. asiatica*; 3: Asiaticósido; 4: Ácido madecásico; 5: Ácido asiático; 6: Ácido corosólico. Fase móvil: n-butanol: EtOAc: NH₃: H₂O=6:4:0,5:1 Reactivo revelador: PAS.

5.1.2.2 Extracción sólido-líquido (Soxhlet)

De acuerdo a la metodología descrita para este proceso en el punto 4.3.2.2 del Capítulo Materiales y Métodos, se logró obtener una fracción rica en sapogeninas denominada SAE con un 10,0% de rendimiento, tal como lo indica la **Fig. 08**

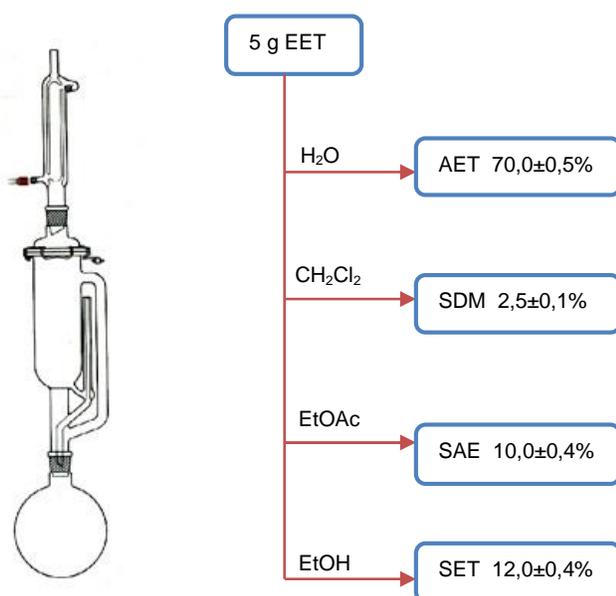


Fig. 08: Esquema y rendimiento de una extracción mediante un equipo Soxhlet, para la obtención de una fracción rica en sapogeninas triterpénicas denominada SAE.

Con respecto a la presencia de sapogeninas presentes en SAE, se pudo observar en la c.c.f. de la **Fig. 09** que posee un compuesto nuevo, coincidente al R_f del patrón de ácido madecásico, que al igual que en la F-AcEt aparece más acentuada su coloración en c.c.f respecto del EET, debido a que ambas son fracciones purificadas desde dicho extracto etanólico.

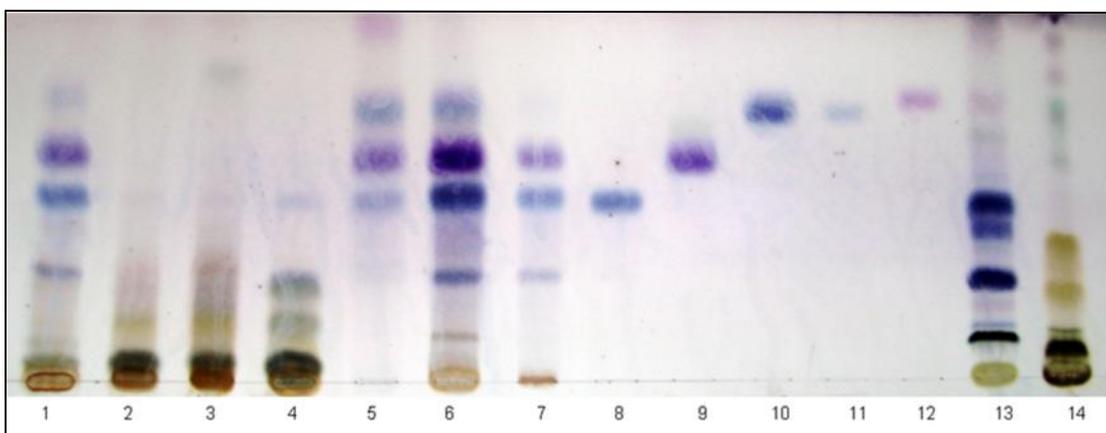


Figura 09: Cromatografía en capa fina de extracción de EET mediante equipo Soxhlet. 1: EET; 2: AET; 3: FOrg2; 4: F-Acu 1; 5: SDM; 6: SAE; 7: SET; 8: Ácido asiático; 9: Ácido corosólico; 10: Mezcla de ácidos ursólico y oleanólico; 11: Ácido ursólico; 12: Ácido betulínico; 13: Extracto *C. asiatica*; 14: Saponinas *Q. saponaria*. Fase móvil: n-butanol: EtOAc: NH₃: H₂O = 6: 4: 0,5: 1; Reactivo revelador: PAS.

Comparando ambas técnicas para la obtención de una fracción rica en saponinas, podemos decir que la extracción líquido-líquido es una técnica de alta complejidad operacional, la muestra no es totalmente homogénea (se forman emulsiones, debido a que el EET no es altamente soluble), en cambio la extracción mediante equipo Soxhlet posee la ventaja de ser mucho más eficiente en comparación con la extracción líquido-líquido, es altamente reproducible; cabe destacar que a diferencia de las extracciones que comúnmente se realizan con disolventes de polaridad creciente, en este caso se inició con agua, con el fin de reducir la cantidad de taninos y compuestos fenólicos presentes en el EET.

Con respecto a las geninas que aparecen en c.c.f. (**Fig. 10**) para cada método, no hay diferencias cualitativas significativas en las saponinas, por lo que para el aislamiento en CC de la nueva genina (denominada U7) se podría haber usado como muestra cualquiera de las dos fracciones ricas en triterpenoides.

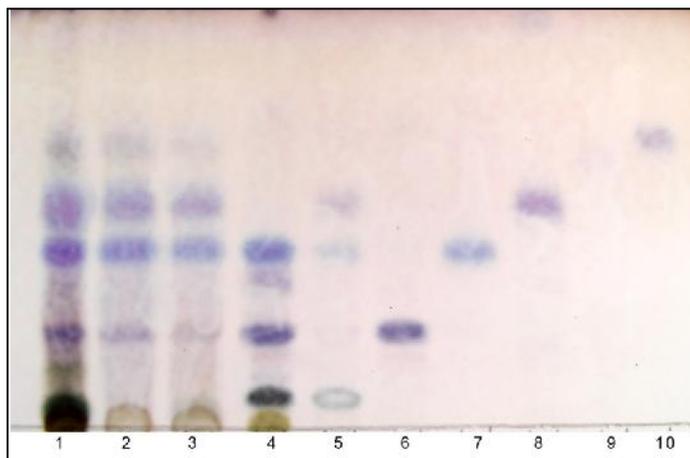


Fig.10: Cromatografía en capa fina comparativa de ambas extracciones para la obtención de una fracción rica en sapogeninas triterpénicas. 1: EET; 2: F-AcEt; 3: SAE; 4: Extracto *C. asiatica*; 5: Asiaticósido; 6: Ácido madecásico; 7: Ácido asiático; 8: Ácido corosólico; 9: Mezcla de ácidos alfitólico y corosólico; 10: Ácido oleanólico. Fase móvil: n-butanol: EtOAc: NH₃: H₂O=6:4:0,5:1. Reactivo revelador: PAS.

5.1.3 Aislamiento de sapogeninas

5.1.3.1 Fraccionamiento de la F-AcET mediante CC de gel de sílice (CC MJQ1):

3,5 g de F-AcEt (fracción rica en sapogeninas obtenida mediante partición líquido-líquido del EET punto 4.3.2.1 del Capítulo Materiales y Métodos) fueron fraccionados en CC de gel de sílice 60G (0,0063-0,200 mm), bajo las siguientes condiciones:

- Muestra: F-AcEt
- Peso: 3,5 g
- Adsorbente: sílica gel 60G (0,0063-0,200 mm)
- Peso: 355 g
- Dimensiones de la columna (alto*diámetro): 39,0*5,8 cm
- Cuerpo/cabeza (cm): 24,5/1 cm
- Cantidad de adsorbente en la cabeza: 3,5 g
- Volumen de eluyente: 1000 mL de fase móvil
- Composición de la fase móvil: ver Tabla N^o1

Las fracciones obtenidas fueron monitoreadas mediante c.c.f. usando como medio de desarrollo n-butanol: EtOAc: NH₃: H₂O (6: 4: 0,5: 1), y revelado con PAS, aquellas

que presentaron un perfil cromatográfico similar se juntaron en una y se concentraron a presión reducida, obteniéndose el siguiente resultado:

Tabla 04: Resumen de la obtención de fracciones de CC MJQ-1

Fracciones	Peso seco (mg)	Rendimiento (%)	Observaciones
3	422,0	12	Ácido corosólico-ácido alfitólico
4	260,0	7,4	Ácido corosólico
5	437,0	12,5	Ácido corosólico-ácido asiático
6	112,0	3,2	Ácido asiático-X
12-44	57,0	1,6	Ácido asiático-X – U7

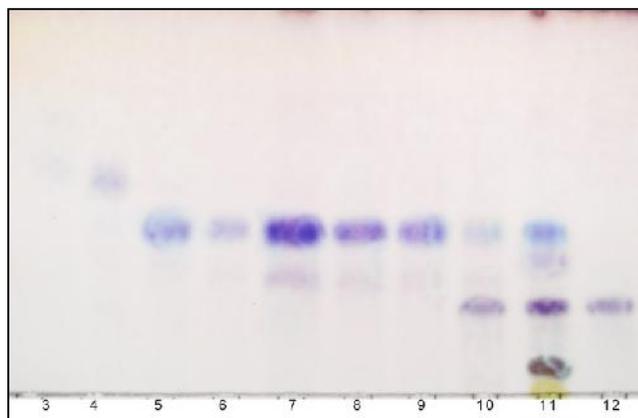


Fig.11: Resumen de la c.c.f. de CC-MJQ1. 3: Ácidos corosólico y alfitólico; 4: Ácido corosólico; 5: Ácidos corosólico y asiático; 6: Ácido asiático; 7: Ácido asiático y X; 8: Ácido asiático y X; 9: Ácido asiático y X; 10: Ácido asiático, X y U7 (conjunto de fracciones 12-44); 11: Extracto *C. asiatica*; 12: Ácido madecásico. Fase móvil: n-butanol: EtOAc: NH₃: H₂O= 6:4:0,5:1. Revelador: PAS.

Las fracciones 12-44 se reunieron en una y según c.c.f aparecen dos nuevas sapogeninas denominadas X y U7 cuyos R_f son 0,33 y 0,22 respectivamente. El perfil cromatográfico de U7 es muy similar al patrón de ácido madecásico, por lo que podría tratarse de éste, para confirmar la pureza de la muestra, ésta fue analizada mediante CLAE bajo las condiciones descritas en el Capítulo de Materiales y Métodos y posteriormente a su resultado positivo fue analizada mediante CLAE-UV-ESI-EM para la elucidación estructural del compuesto X y confirmación de la presencia de U7 como ácido madecásico.

*Nota: las fracciones 7, 8, 9 que aparecen en la c.c.f., no fueron adjuntas a la **Tabla 04**, debido a que la cantidad obtenida fue muy pequeña.

5.1.3.2 Fraccionamiento de la F-AcET mediante CC de gel de sílice (CC MJQ2)

Debido a que el objetivo es aislar la sapogenina denominada U7, se decidió realizar otra CC, bajo condiciones similares a la anterior, para ello se utilizaron 2,5 g de F-AcEt (fraccionamiento de una fracción rica en sapogeninas obtenida mediante extracción líquido-líquido del EET, punto 4.3.2.1 del Capítulo Materiales y Métodos) se fraccionó en CC de gel de sílice 60 (0,0063-0,200 mm), bajo las siguientes condiciones:

- Muestra: F-AcEt
- Peso: 2,5 g
- Adsorbente: sílica gel 60G (0,0063-0,200 mm)
- Peso: 355 g
- Dimensiones de la columna (alto*diámetro): 39,0*5,8 cm
- Cuerpo/cabeza (cm): 24,5/1 cm
- Cantidad de adsorbente en la cabeza: 3,5 g
- Volumen de eluyente: 1000 mL de fase móvil
- Composición de la fase móvil: ver Tabla N°2

Las fracciones obtenidas fueron monitoreadas mediante c.c.f. usando como medio de desarrollo n-butanol: EtOAc: NH₃: H₂O (6: 4: 0,5: 1) y revelado con PAS, todas aquellas que presentaron un perfil cromatográfico similar se juntaron en una y se concentraron a presión reducida obteniéndose el siguiente resultado:

Tabla 05: Resumen de la obtención de fracciones desde la CC MJQ-2

Fracciones	Peso seco (mg)	Rendimiento (%)	Observaciones
9-10	117,6	4,7	Ácido corosólico
11-20	473,0	18,2	Ácido corosólico y ácido asiático
21-36	499,3	20,0	Ácido asiático
37-65	621,8	24,9	Ácido asiático y ácido madecásico

El conjunto de fracciones que presentaron un perfil cromatográfico similar, donde U7 aparece más limpio, fue entre las fracciones 37 a la 65, por lo que este conjunto de fracciones fue seleccionado para realizar una CC Sephadex®, la cual resultaría

eficiente para separar los componentes de la muestra de acuerdo a su peso molecular y polaridad.

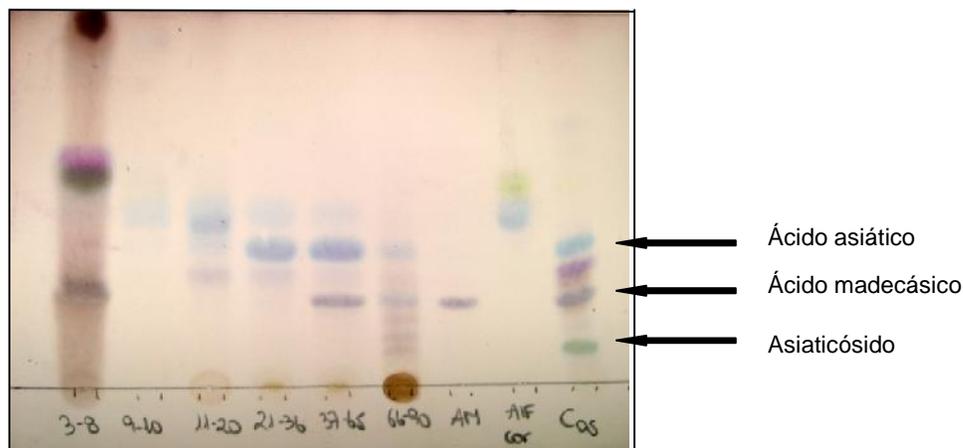


Fig.12: C.c.f resumen de la CC-MJQ2. Fase móvil: n-butanol: EtOAc: NH₃: H₂O (6: 4: 0,5: 1). Revelador: PAS.

5.1.3.3 Fraccionamiento de SAE mediante CC de gel de sílice (CC MJQ3)

Para confirmar la presencia de las geninas de interés X y U7 en ambas fracciones ricas en sapogeninas obtenidas por las metodologías distintas anteriormente mencionadas; se decide fraccionar 1,0 g de SAE (fracción rica en sapogeninas obtenida mediante extracción sólido-líquido del EET, punto 4.3.2.2 del Capítulo Materiales y Métodos) se fraccionó en CC de gel de sílice 60 (0,0063-0,200 mm), bajo las siguientes condiciones:

- Muestra: SAE
- Peso: 1,0 g
- Adsorbente: sílica gel 60G (0,0063-0,200 mm)
- Peso: 75 g
- Dimensiones de la columna (alto*diámetro): 38,5*3,7 cm
- Cuerpo/cabeza (cm): 16,5/1 cm
- Cantidad de adsorbente en la cabeza: 4 g
- Volumen de eluyente: 500 mL de fase móvil
- Composición de la fase móvil: ver Tabla N°3

Las fracciones obtenidas fueron monitoreadas mediante c.c.f. usando como medio de desarrollo n-butanol: EtOAc: NH₃: H₂O (6: 4: 0,5: 1) y revelado con PAS, todas aquellas que presentaron un perfil cromatográfico similar se juntaron en una y se concentraron a presión reducida obteniéndose el siguiente resultado:

Tabla 06: Resumen de la obtención de fracciones de la CC MJQ-3

Fracciones	Peso seco (mg)	Rendimiento (%)	Observaciones
1-3	6,4	0,64	Ácido corosólico
4-6	34,3	3,43	Ácido alfitólico, Z, corosólico
7	91,4	9,14	Acido alfitólico, Z, ácido corosólico, Y.
8	68,5	6,85	Acido alfitólico, Z, ácido corosólico, ácido asiático, Y, X
9-10	81,1	8,11	Ácido corosólico, ácido asiático, y, x, U7
11-12d	96,7	9,67	Ácido corosólico, acido asiático, x, U7
13-19	246	24,6	U7, impurezas

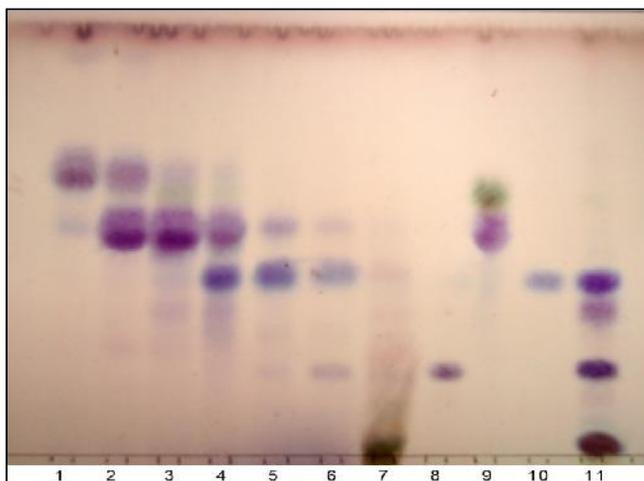


Fig.13: Placa cromatográfica resumen de la CC-MJQ3. Fracciones de perfil cromatográfico similar, 1(fr.1-3); 2 (fr.4-6); 3 (fr.7); 4 (fr.8); 5 (fr.9-10); 6 (fr.11-12d); 7 (fr.13-19); 8 (ácido madecásico); 9 (mezcla de ácidos alfitólico y corosólico); 10 (ácido asiático); 11 (extracto de *C. asiática*). Fase móvil: n-butanol: EtOAc: NH₃: H₂O= 6:4:0,5:1. Revelador: PAS.

Se verificó la pureza de las fracciones 11-12d por CLAE para verificar su pureza y posteriormente será analizada por CLAE-UV-ESI-MS para la elucidación estructural tanto de X y U7.

5.1.3.4 CC-Seph1-4: fraccionamiento de MJQ-2 (37-65)

Las fracciones 37 a la 65 obtenidas en la CC-MJQ-2 se vuelven a fraccionar mediante un total de cuatro CC de Sephadex bajo las siguientes condiciones:

- Muestra: MJQ2 (37-65)
- Peso: 100 mg
- Diámetro columna (alto*diámetro): 32,7*5 cm
- Cabeza: 20 mL de fase móvil saturada con muestra
- Fase móvil: Hexano:CH₂Cl₂:MeOH (6,2: 1,2: 2,7)
- Volumen de cada fracción: 30 mL

Las fracciones obtenidas fueron monitoreadas en c.c.f. usando como medio de desarrollo n-butanol: EtOAc: NH₃: H₂O (6: 4: 0,5: 1) y revelado con PAS, todas aquellas que presentaron un perfil cromatográfico similar se juntaron y se concentraron a presión reducida obteniéndose los siguientes resultados:

Tabla 07: CC Seph1

Fracción	mg	%	Observaciones
1-23	17,3	17,3	Ácido corosólico-ácido asiático
24-42	11,1	11,1	Ácido asiático-U7
43-75	1,4		U7- impurezas

Tabla 08: CC Seph2

Fracción	mg	%	Observaciones
1-17	--	--	--
18-30	11	11	Acido asiático
31-50	9,6	9,6	Acido asiático-U7
51-105	10,4	10,4	Acido asiático-U7- impurezas

Tabla 09: CC Seph3

Fracción	mg	%	Observaciones
1-29	6,7	6,7	Acido asiático
30-63	6,4	6,4	Acido asiático-U7

Tabla 10: CC Seph4

Fracción	mg	%	Observaciones
1-32	6,7	6,7	Acido asiático
30-67	6,4	7,4	Acido asiático-U7

El objetivo de estas 4 CC fue obtener el compuesto U7 aislado, debido a que no resultó, las fracciones que contenían ácido asiático y U7 fueron purificadas mediante PCP.

5.1.3.5 Aislamiento de U7 mediante placa cromatográfica preparativa (PCP)

Debido a que la técnica de aislamiento de U7 por CC Sephadex®LH-20 no fue la metodología idónea para purificarlo, se decidió juntar todas aquellas fracciones que en c.c.f. mostraran la presencia de ácido asiático y U7, lo que fue corroborado con los patrones correspondientes. Estas fracciones fueron sometidas a una PCP para aislar el U7.

Se utilizaron placas cromatográficas obtenidas en el laboratorio en forma artesanal (ver punto 4.3.3.3 del Capítulo Materiales y Métodos), en las cuales se sembraron a 2 cm de la base de ésta la muestra. La fase móvil utilizada fue n-butanol: EtOAc: NH₃: H₂O (5: 4: 0,5: 2) y posteriormente revelada sólo un sector de ella, tal como lo indica la metodología con PAS. Se realizaron sucesivas PCP hasta lograr recolectar aproximadamente 10 mg de U7 aislado, previo análisis en c.c.f. para corroborar de que esté sin ningún interferente aparente.

5.1.4 Determinación de la pureza de U7 y X mediante CLAE

El compuesto U7, fue obtenido por PCP mediante previa filtración en membrana de PVDF 0,22 µm, tal como se describe en el Capítulo Materiales y Métodos, obteniéndose aproximadamente 10 mg de un sólido blanco amarillento. Se comprobó la pureza por CLAE antes de ser enviada a RMN bajo las condiciones mencionadas en el punto 4.5 de dicho capítulo.

El compuesto U7 tiene un tiempo de retención de 6,18 min, y un 97,0 % de pureza.

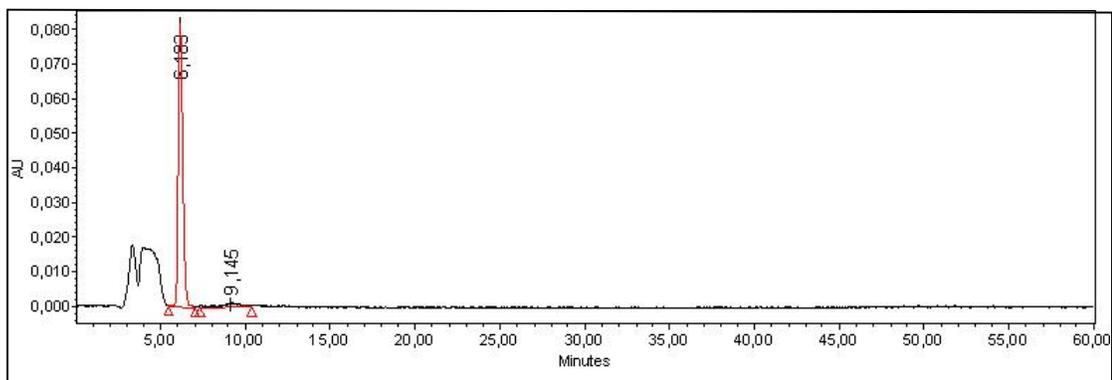


Fig.14: Cromatograma CLAE para U7 (0,8 mg/mL)
 en acetonitrilo: H₃PO₄ al 0,1% en agua = 60:40 v/v.

Tabla 11: Tiempo de retención y % de pureza

Compuesto	Tiempo de retención (min)	% área
U7	6,18	96,96

En vista de la alta pureza obtenida de U7, éste fue enviado a RMN para su dilucidación estructural.

El fraccionamiento de la F-AcEt en CC de gel de sílice (CC MJQ-1) llevó a la obtención de nuevas sapogeninas para la especie en estudio, denominadas X y U7 a partir de las fracciones eluidas con CH₂Cl₂: EtOAc (60:40) a CH₂Cl₂: EtOAc (30:70), obteniéndose 57 mg de una fracción rica en sapogeninas triterpénicas. Debido a la presencia de estos dos nuevos compuestos, será esta fracción candidata para ser enviada a CLAE-UV-ESI-MS, pero antes se decidió corroborar la presencia de estos 3 compuestos mediante CLAE, bajo las condiciones mencionadas en el punto 4.5 del Capítulo Materiales y Métodos, obteniéndose el siguiente resultado:

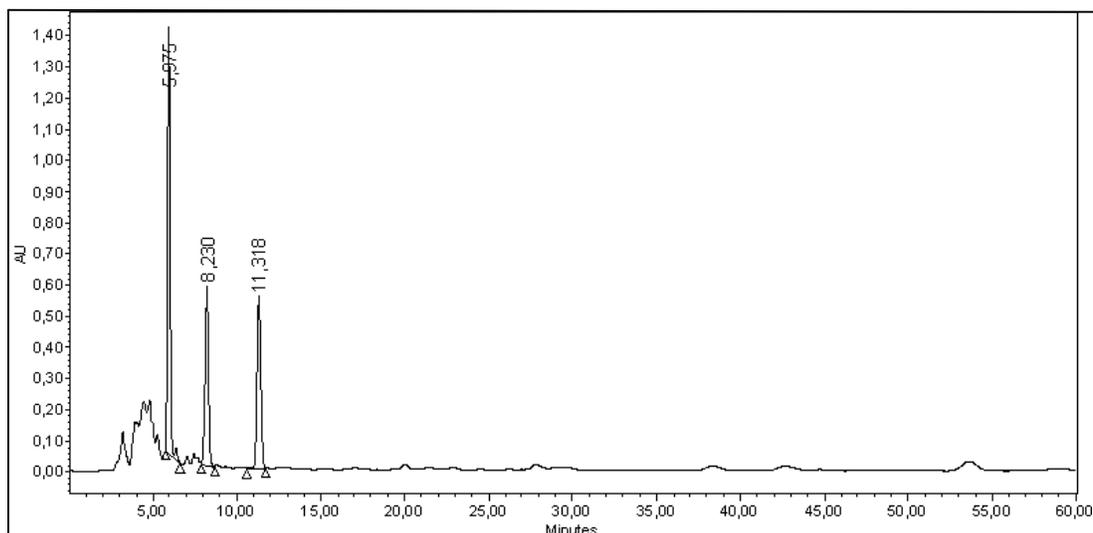


Fig.15: Cromatograma de la muestra MJQ-1 (12-44), candidata a CLAE-UV-ESI-MS.
Donde el tr fue de: U7 5,975 min, ácido asiático 8,230 min, X 11,318 min.

El tiempo de retención para los componentes de la muestra y su % de abundancia son los siguientes (**Ver Tabla 12**):

Tabla 12: Tiempo de retención y % de abundancia de los triterpenos presentes en la muestra MJQ-1 (12-44)

Compuesto	Tiempo de retención (min)	% de área
U7	5,975	42,60
Ácido asiático	8,230	31,24
X	11,318	26,17

El fraccionamiento de SAE en CC de gel de sílice (MJQ-3) llevó a la obtención de las sapogeninas X y U7 a partir de las fracciones eluidas con CH₂Cl₂: EtOAc (30:70) a CH₂Cl₂: EtOAc (20:80), obteniéndose 96,7 mg de una fracción rica en triterpenos. La muestra antes de ser enviada a CLAE-UV-ESI-MS se decide corroborar la presencia de estos compuestos mediante CLAE, bajo las condiciones mencionadas en el punto 4.5, obteniéndose el siguiente resultado:

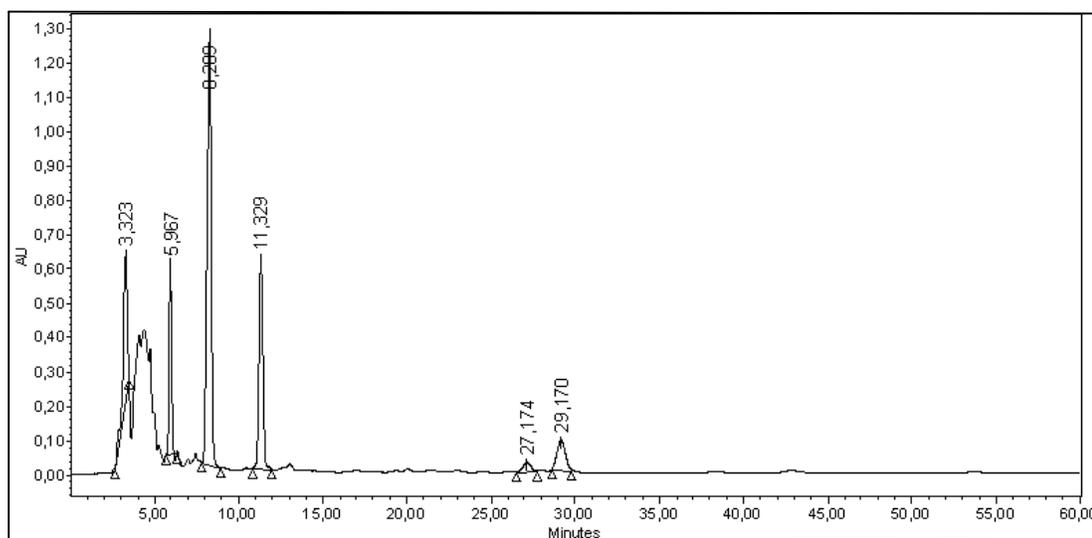


Fig.16: Cromatograma de la muestra MJQ-3 (11-12d), candidata a RMN. Donde el tiempo de retención de 5,975 (U7), 8,200 (ácido asiático), 11,329 (X).

El tiempo de retención para los componentes de la muestra y su % de abundancia son los siguientes (**Ver Tabla 13**):

Tabla 13: Tiempo de retención y % de abundancia de los triterpenos presentes en la muestra MJQ-3

Compuesto	Tiempo de retención (min)	% de área
Y	3,323	12,34
U7	5,967	13,46
Ácido asiático	8,289	42,89
X	11,329	21,23

Al comparar los cromatogramas, se puede observar la presencia de los compuestos X y U7 en ambas muestras, mostrando un tiempo de retención aproximado de 5,9 min para U7 y 11,3 min para X, por lo que se decide enviar a CLAE-UV-ESI-MS la última muestra, para así lograr la dilucidación estructural de X y también usar esta metodología como complementaria para la dilucidación estructural de U7.

5.1.5 Determinación estructural

U7 se identificó como ácido madecásico (ácido 2 , 3 , 6 , 23 tetrahidroxi-urs-12(13)-eno-28-oico).

En CLAE-UV-ESI-¹MS, se observó un $[M-H]^- = 503,1$ (**Ver anexo A**), por lo que su peso molecular (PM) $C_{30}H_{48}O_6$ correspondió a 504,1 g/mol.

En el espectro de RMN-¹H (**Ver Anexo B₁**) se observó un triplete a 5,28 ppm correspondiente al protón olefínico H-12, un doblete a 2,23 ppm asignable a H-18 y seis señales de metilos, 5 singuletes a 0,89 ppm (Me-24), 0,94 ppm (Me-26), 0,96 ppm (Me-30), 1,06 ppm (Me-23 y Me-25) y 1,14 ppm (Me-27) respectivamente, doblete centrado a 0,91 ppm correspondiente al Me-29. Las señales obtenidas son características de una estructura triterpénica pentacíclica derivada del núcleo ácido urs-12(13)-en-28-oico y sus valores están correlacionados de manera similar a los desplazamientos químicos del ácido asiático, ya que mantienen la misma estructura base, diferenciándose sólo por un hidroxilo en el C-6.

El espectro de RMN-¹³C (**Ver Anexo B₂, B₃**) mostró dos señales de carbonos olefínicos a 127,08 ppm (C-12) y 139,17 ppm (C-13), una señal a 181,67 ppm correspondiente al ácido carboxílico (C-28) y tres señales de carbonos alifáticos a campo bajo correspondiente a los carbonos unidos a átomos de oxígeno C-2, C-3 y C-23 (69,75; 78,38 y 66,16 ppm respectivamente). La asignación completa de los datos para RMN-¹³C se muestra en la **Tabla 14** y las señales concuerdan con los datos reportados en la literatura.

Tabla 14: Señales de RMN-¹³C de U-7 y datos de literatura para ácido madecásico.

C		U7 DEPT-135	U7 Metanol-d ₄	Ácido madecásico (Du <i>et al.</i> , 2004) pyridine-d ₅	Ácido madecásico (Du <i>et al.</i> , 2004) Metanol- d ₄
1	CH ₂	50,32	50,31	48,2	50,4
2	CH	69,76	69,75	68,9	69,7
3	CH	78,38	78,38	78,7	78,3
4	C		44,80	43,1	44,8
5	CH	---		48,7	48*
6	CH	68,48	68,48	67,6	68,5
7	CH ₂	41,39	41,38	39,3	41,3
8	C	---	38,66	39,5	38,5
9	CH			48,9	48*
10	C		39,86	37,9	40,2
11	CH ₂	24,52	24,52	25,0	24,6
12	CH	127,08	127,07	126,0	127,4
13	C		139,17	138,6	138,7
14	C		43,90	44,2	43,9
15	CH ₂	28,86	28,85	28,7	29,3
16	CH ₂	25,39	25,39	26,0	25,4
17	CH			48,0	48*
18	CH	54,51	54,51	53,3	54,4
19	CH		40,05	38,0	40,2
20	CH	40,49	40,48	39,0	40,5
21	CH ₂	31,86	31,85	31,0	31,8
22	CH ₂		38,19	37,5	37,6
23	CH ₃	66,14	66,16	66,5	66,1
24	CH ₃	15,28	15,27	15,5	15,3
25	CH ₃		17,66	17,4	17,6
26	CH ₃	19,41	19,39	18,7	19,5
27	CH ₃		24,23	23,7	24,0
28	C		181,67	179,2	178,1
29	CH ₃		18,86	17,6	17,8
30	CH ₃		21,59	21,1	21,5

: Señal debida al solvente. *: Desplazamiento bajo la señal del solvente.

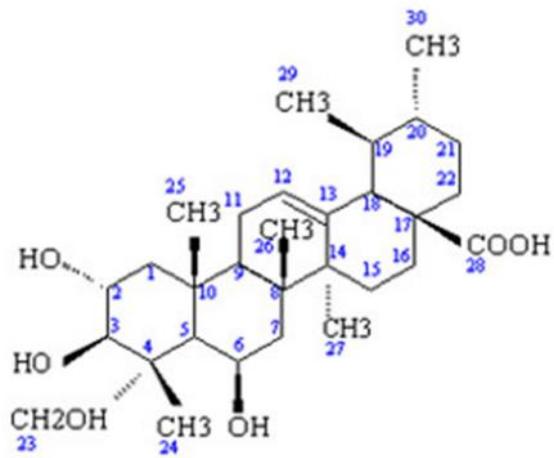


Fig 17: Estructura química para U7, ácido madecásico.

5.2 Evaluación de la actividad inhibitoria de la enzima glicógeno fosforilasa a (GPa) de los distintos extractos y sub-extractos de *Ugni molinae*

Fueron evaluados los extractos y fracciones ricas en sapogeninas de *Ugni molinae* frente a GPa usando como control positivo cafeína (fármaco de referencia). Se obtuvo su $IC_{50} = 110 \pm 6 \mu\text{M}$ (**Fig. 18**); muy similar al que aparece en la literatura, el cual es de $114 \mu\text{M}$ (Wen *et al.*, 2008). Los resultados obtenidos para el fármaco de referencia son los siguientes (**Ver Tabla 15 y 16**)

Tabla N°15: Resultados obtenidos de cafeína frente a GPa

		20 μM		50 μM		100 μM		200 μM		350 μM		500 μM		650 μM		750 μM		1000 μM	
		A	%I	A	%I	A	%I	A	%I	A	%I	A	%I	A	%I	A	%I	A	%I
		0,432	16,7	0,399	20,3	0,347	36,7	0,320	43,3	0,273	67,8	0,215	74,2	0,193	78,6	0,164	87,2	0,151	90,3
		0,394	27,2	0,406	18,3	0,377	28,3	0,314	45,0	0,322	54,2	0,215	74,2	0,206	75,0	0,185	81,4	0,151	90,3
		0,421	19,7	0,402	19,4	0,392	24,2	0,312	45,6	0,305	58,9	0,209	75,8	0,202	76,1	0,149	91,4	0,151	90,3
		0,398	26,1	0,399	20,3	0,355	34,4	0,334	39,4	0,315	56,1	0,188	81,7	0,221	70,8	0,148	91,7	0,154	89,4
		0,423	19,2	0,406	18,3	0,370	30,3	0,336	38,9	0,301	60,0	0,188	81,7	0,203	75,8	0,172	85,0	0,154	89,4
		0,425	18,6	0,406	18,3	0,365	31,7	0,320	43,3	0,263	70,6	0,201	78,1	0,236	66,7	0,166	86,7	0,155	89,2
Prom		0,416	21,3	0,403	19,2	0,368	30,9	0,323	42,6	0,297	61,3	0,203	77,6	0,210	73,8	0,164	87,2	0,153	89,8
SD		0,016		0,003		0,016		0,010		0,023		0,012		0,016		0,014		0,002	

Tabla 16: Porcentaje de inhibición (%I) de la cafeína frente a GPa

μM	%I \pm SD
20	22,5 \pm 5,0
50	19,2 \pm 0,9
100	23,9 \pm 19,0
200	35,0 \pm 20,2
350	62,9 \pm 7,32
500	78,5 \pm 3,98
650	72,7 \pm 4,98
750	86,2 \pm 4,50
1000	89,4 \pm 1,10

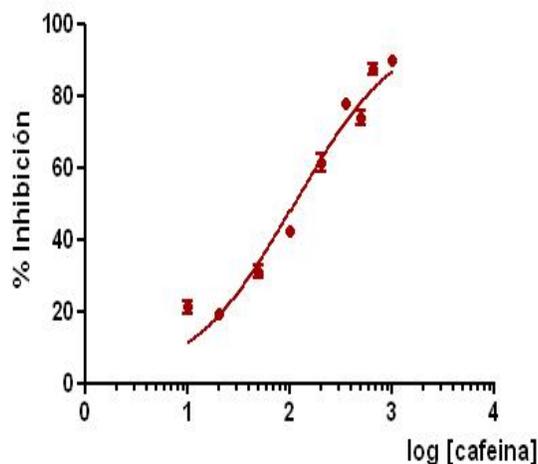


Fig.18: Gráfico %I vs Log [cafeína]. Siendo el $IC_{50} = 110 \pm 6 \mu M$.

Las muestras evaluadas se hicieron en un rango de concentraciones entre 20-1000 $\mu g/mL$, para así poder determinar la relación concentración versus respuesta. Para determinar dicha concentración se evaluó la reproducibilidad de los resultados, concluyendo que a una concentración de 60 $\mu g/mL$ se pueden realizar determinaciones con una variabilidad aceptable y los extractos seleccionados para ser evaluados, se disuelven perfectamente a esta concentración. El medio acuoso de la reacción enzimática no permitió la evaluación de extractos apolares sin superar el límite de concentración de DMSO aceptado frente a la GPa (límite correspondiente a 10%).

Junto con la evaluación de los extractos EAE, EET y el sub-extracto SAE; se evaluó un extracto estandarizado de *Centella asiatica* que contiene un 40% de asiaticósido y 60% de los ácidos asiático y madecásico, el cual permitió ser un control positivo y así evaluar en forma comparativa los extractos de *U. molinae*, obteniéndose los siguientes resultados:

Tabla 17: Resultados de los extractos de *U. molinae* y *Centella asiatica* frente a GPa.

	CN	B	C.as		EAE			EET			SAE			
			CNE	%I	EAE	CNE	%I	EET	CNE	%I	SAE	CNE	%I	
1	0,631	0,084	0,427	0,129	46,40	0,410	0,137	50,90	0,187	0,147	92,81	0,164	0,118	91,73
2	0,664	0,087	0,357		58,99	0,412		50,54	0,184		93,35	0,158		92,81
3	0,650	0,086	0,387		53,60	0,453		43,17	0,187		92,81	0,161		92,27
4	0,635	0,087	0,399		51,44	0,427		47,84	0,188		92,63	0,162		92,09
5	0,615	0,086	0,359		58,63	0,477		38,85	0,179		92,24	0,162		92,09
6	0,621	0,088	0,387		53,60	0,437		46,04	0,196		91,19	0,178		89,21
7	0,681	0,087	0,387		53,60	0,447		44,24	0,201		90,29	0,167		91,19
Prom	0,642	0,086	0,386			0,438			0,189			0,165		
SD	0,024	0,001	0,024			0,024			0,007			0,007		
CV	3,7	1,5	6,2			5,4			3,9			4,0		

De acuerdo a los resultados expuestos en la tabla anterior, los resultados finales para cada muestra evaluada frente a GPa son los siguientes (Tabla 18):

Tabla 18: Efecto inhibitorio sobre GPa de los extractos, sub-extracto de *U. molinae* y de un extracto estandarizado de *C. asiatica*.

Extracto (60 µg/mL)	%I ± SD
C.as	53,8 ± 4,3
EAE	45,9 ± 4,3
EET	92,2 ± 1.1
SAE	91,6 ± 1.2

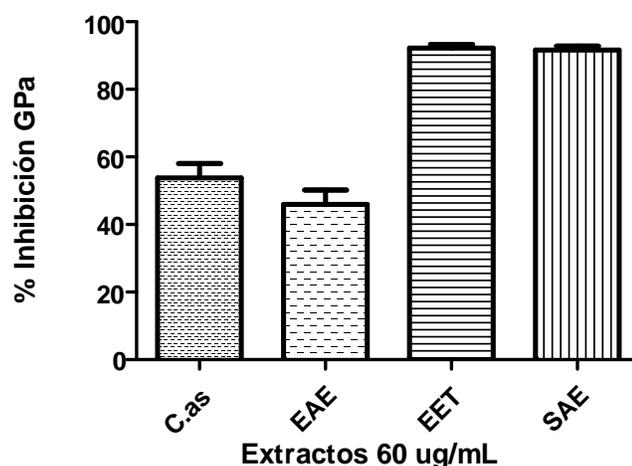


Fig. 19: Efecto inhibitorio sobre la GPα de un extracto estandarizado de *C. asiatica*, extractos y sub-extractos de *U. molinae*.

Por test de normalidad de Shapiro-Wilk y evaluación de la distribución de frecuencia de datos se pudo observar que a una concentración de 60 µg/mL los resultados presentan una distribución paramétrica realizando los análisis estadísticos por ANOVA y comparando los resultados mediante la prueba de comparaciones múltiples de Tukey (**Tabla 19**), demostrando que no hay diferencias significativas entre EET y SAE. El EAE y C.as fueron menos activo que los EET y SAE frente a la GPα. La actividad de los extractos evaluados podría ser atribuida en parte a los triterpenoides pentacíclicos presentes en estos extractos bioactivos de acuerdo con Wen *et al.* (2008), éstos autores evaluaron 25 triterpenos pentacíclicos la mayoría exhibió actividad inhibitoria moderada contra GPα, destacando los ácidos oleanólico, ursólico, asiático, corosólico y maslínico demostraron que son buenos inhibidores de la GPα, infiriendo que la diversidad del esqueleto estructural de los triterpenos pentacíclicos no tiene un impacto significativo en la inhibición, ya que los tres tipos de triterpenos (derivados del oleanano, ursano y lupano) mostraron actividad inhibitoria, sino que más bien la cantidad, posición y configuración de los grupos hidroxilos pareciese tener un mayor impacto sobre la potencia inhibitoria.

Tabla 19: Prueba de comparaciones múltiples de Tukey para el efecto inhibitorio de los extractos y sub-extracto de *U. molinae* y un extracto estandarizado de *C. asiatica* sobre GP_a

	EAE	EET	SAE	C. as
EAE	---	***	***	**
EET	***	---	n.s	***
SAE	***	n.s	---	***
C. as	**	***	***	---

n.s: no significativo ($p > 0,05$); *: significativo ($0,01 > p < 0,05$); **: muy significativo ($0,001 < p < 0,01$); *: extremadamente significativo ($p < 0,001$).

VI CONCLUSIONES

Se determinó la metodología óptima para la obtención de una fracción purificada rica en sapogeninas a partir de hojas de *Ugni molinae*, y esta fue la extracción sólido-líquido (Soxhlet).

Se aislaron 2 sapogeninas, denominadas U7 y X. U7 corresponde a un triterpenoide pentacíclico derivado del núcleo ursano denominado ácido madecásico (ácido 2 α , 3 β , 6 β , 23 tetrahidroxi-urs-12(13)-eno-28-oico), el cual no ha sido descrito para *Ugni molinae*. En tanto, la sapogenina denominada X se encuentra en vías de identificación.

Se evaluaron 2 extractos y un sub-extracto de *Ugni molinae* frente a glicógeno fosforilasa a. Todas las muestras presentaron poder inhibitorio frente a GP_a, siendo más activos el extracto etanólico y el sub-extracto SAE, dichos extractos presentaron el mayor poder inhibitorio de la actividad de la enzima (> 90% de inhibición).

La inhibición de la GP_a se debe en parte a la presencia de triterpenoides pentacíclicos presentes en los extractos bioactivos.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

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

AGUIRRE, M.C. Aislamiento e identificación de los principios activos antiinflamatorios y antioxidantes de las hojas de *Ugni molinae* Turcz (murtilla) Myrtaceace. Obtención de un extracto estandarizado. Tesis para optar al grado de Doctor en Ciencias Farmacéuticas. Santiago, Chile. Universidad de Chile, Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas, 2007.

AVELLO, M. Estudio fitoquímico de las hojas de *Ugni molinae* ("Murtilla") y evaluación de las propiedades antioxidantes de sus componentes. Trabajo de fin de carrera para optar al título de Químico-Farmacéutico. Concepción, Chile. Universidad de Concepción, Facultad de Farmacia, 2000.

AVELLO, M., Pastene, E. Efectos de *Ugni molinae* ("MURTILLA") sobre la peroxidación lipídica *in vitro*. En: Congreso Internacional Farmacéutico: 6 - 9 abril de 2003. Santiago, Chile. Colegio de Químico-Farmacéuticos de Chile.

AVELLO, M., Pastene, E. Actividad antioxidante de infusos de *Ugni molinae* Turcz. ("murtilla"). BLACPMA. 4(2):33-39, 2005.

BRITISH PHARMACOPEIA. 2001. London, Stationery Office.

CARO, I. Determinación de la efectividad de una formulación cosmética en base a un extracto de las hojas de *Ugni molinae* en el tratamiento de la lipodistrofia (celulitis). Memoria para optar al título de Química-Farmacéutica. Santiago, Chile. Universidad de Chile, Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas, 2009.

CAVA, N. Aplicación de metodologías por CLAE para la cuantificación de principios activos obtenidos desde especies vegetales autóctonas. Memoria para optar al título de Químico Laboratorista. Santiago, Chile. Universidad Tecnológica Metropolitana, Facultad de Ciencias Naturales, Matemáticas y del Medio Ambiente, 2011.

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

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

DIAMOND, J. The double puzzle of diabetes. Nature 423(6940):599-602, 2003.

- Donoso, C. y Ramírez, C. (1994). Arbustos nativos de Chile. Guía de reconocimiento, segunda edición. Ediciones Marisa Cúneo, 119p.
- DU, Q., Jerz, G., Chen, P., Winterhalter, P. Preparation of Ursane Triterpenoids from *Centella asiatica* Using High Speed Countercurrent Chromatography with Step-Gradient Elution. Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies, 14: 2201-2215, 2004.
- GELDRES, C. Infusión para suavizar el cutis reseco. En: Montenegro, G., Kornfeld, R., Rioseco, V. (Eds.). Concurso secretos de nuestras plantas y otras especies: cómo usarlas en beneficio de las personas. Santiago de Chile, Pontificia Universidad Católica de Chile, Asociación de AFP, Programa para el adulto mayor, 2005, pp.63.
- GREEN, A., Hirsch, C., Pramming, SK. The changing world demography of type 2 diabetes. Diabetes Metab Res Rev, 19(1):3-7, 2003.
- HOFFMANN, A. Flora silvestre de la zona austral: árboles, arbustos y enredaderas leñosas. Santiago de Chile, Ediciones Fundación Claudio Gay, 1982, pp. 258.
- HOSTETTMAN, K., Gupta, M., Marston, A., Ferrira, E. Manual de estrategias para el aislamiento de productos naturales bioactivos. 1ª ed. Bogotá, Quebecor Word, 2008, pp.45-65.
- INOSTROZA, V. Evaluación de las actividades analgésicas *in vivo* de *Ugni molinae* Turcz. y sus potenciales efectos antimicrobianos e inhibitorios de la xantina-oxidasa. Memoria para optar al título de Químico-Farmacéutico. Santiago, Chile. Universidad de Chile, Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas, 2005.
- LOBOS, A. Evaluación de la actividad cicatrizante de las hojas de *Ugni molinae* Turcz., Myrtaceae (murtilla) mediante ensayos de proliferación, migración y depósito de proteínas de la matriz extracelular de fibroblastos de piel humana. Memoria para optar al título de Químico-Farmacéutico. Santiago, Chile. Universidad de Chile, Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas, 2006.
- 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 liver glycogen phosphorylase inhibitor that lowers blood glucose in vivo. Proc Natl Acad Sci U S A, 95: 1776-1781, 1998.
- McCORMACK, J.G., Westergaard, N., Kristiansen, M., Brand, C.L., Lau, J. Pharmacological approaches to inhibit endogenous glucose production as a means of anti-diabetic therapy. Curr Pharm Des., 7(14):1451-1474, 2001.
- Moller, D.E. New drug targets for type 2 diabetes and the metabolic syndrome. Nature, 414: 821-827, 2001.

MONTENEGRO, G. Chile nuestra flora útil. Guía de plantas de uso apícola, en medicina folklórica, artesanal y ornamental. Santiago de Chile, Ediciones Universidad Católica de Chile, 2000, pp. 241-242.

MORGANTI, P., Fionda, A., Elia, U., Tiberi, L. Extraction and analysis of cosmetic active ingredients from an anti-cellulitis transdermal delivery system by high-performance liquid chromatography. J. Chromatogr. Sci. 37(2):51-55, 1999.

MUÑOZ, M., Barrera, E., Meza, I. El uso medicinal y alimenticio de plantas nativas y naturalizadas en Chile. Museo de Historia Natural. Santiago de Chile, Publicación ocasional N°33, 1981, pp. 52-53.

OIKONOMAKS, NG. Glycogen phosphorylase as a molecular target for type 2 diabetes therapy. Curr Protein Pept Sci., 3(6):561-586, 2002.

PASTENE, E., Avello, M., González, M., Letelier, M.E., Vega, M. Plantas Chilenas como agentes protectores de complicaciones crónicas de la diabetes. En: Congreso Internacional Farmacéutico: 6 - 9 abril de 2003. Santiago, Chile. Colegio de Químico-Farmacéuticos de Chile.

PEREDO, N. Desarrollo de un producto dermatológico a partir de un extracto estandarizado obtenido de las hojas de *Ugni molinae* Turcz. Memoria para optar al título de Químico-Farmacéutico. Santiago, Chile. Universidad de Chile, Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas, 2008.

ROZZI, S. Las plantas, fuente de salud. Santiago de Chile, Editorial San Pablo, 1984, pp. 230.

RUBILAR, M., Pinelo, M., Ihl, M., Scheuermann, E., Sinero, J., Nuñez, M.J. Murta leaves (*Ugni molinae* Turcz) as a source of antioxidant polyphenols. J. Agric. Food Chem. 54(1):59-64, 2006.

SCHANEBERG B.T., Mikell, J.R., Bedir, E., Khan, I.A. An improved HPLC method for quantitative determination of six triterpenes in *Centella asiatica* extracts and commercial products. Pharmazie 58: 381-4, 2003.

Seguel, I. y Avendaño, L. Aprovechando lo nuestro, murta: Fruto nativo de alta perspectiva comercial. Revista Sofo campo 4(32), 2001.

STILL, W.C., Kahn, M., Mitra, A. Rapid chromatographic technique for preparative separations with moderate resolution. The Journal of Organic Chemistr., 43: 2923-5. 1978.

TREADWAY, J.L., Mendys, P., Hoover, D.J. Glycogen phosphorylase inhibitors for treatment of type 2 diabetes mellitus. Expert Opin Investig Drugs, 10(3):439-54, 2001.

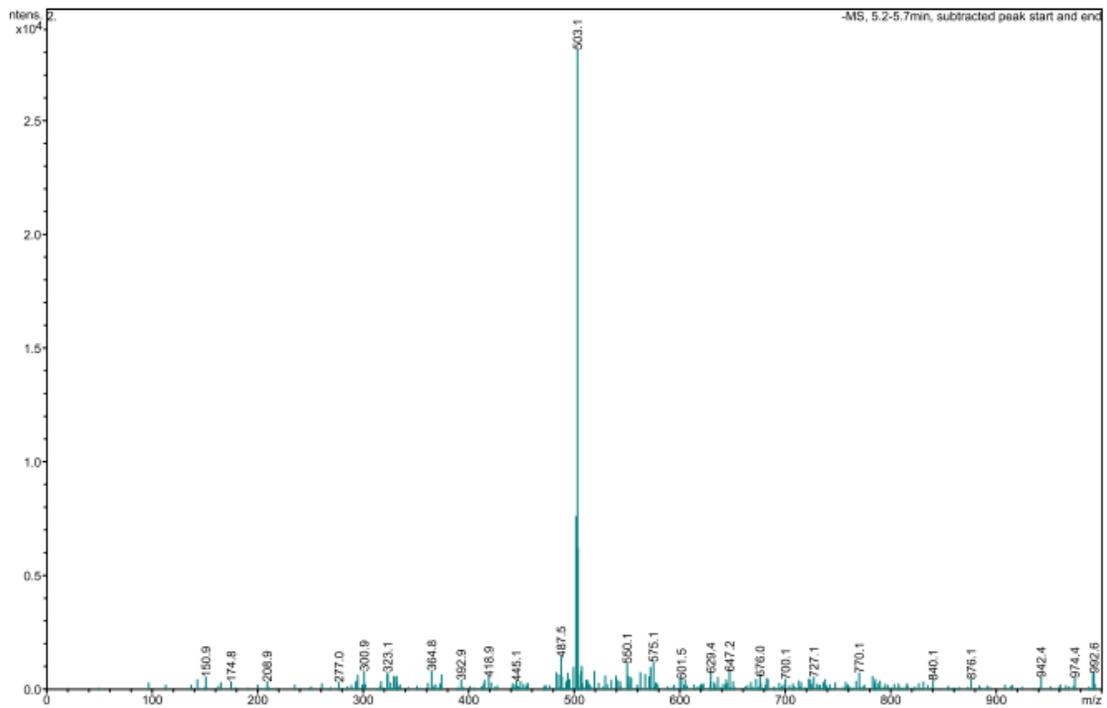
WEN, X., Sun, H., Liu, J., Guanzhong, W., Zhang, L., Wu, X., Peizhou, N. Pentacyclic triterpenes. Part 1: The first examples of naturally occurring pentacyclic triterpenes as a new class of inhibitors of glycogen phosphorylases. J Med Chem., 15: 4944-48, 2005.

WEN, X., Zhang, P., Liu, J., Zhang, L., Wu, X., Peizhou, N., Hongbin, S. Pentacyclic triterpenes. Part 2: Synthesis and biological evaluation of maslinic acid derivatives as glycogen phosphorylase inhibitors. J Med Chem., 16: 722-26, 2006.

WEN, X., Sun, H., Liu, J., Cheng, K., Zhang, P., Zhang, L., Hao, J., Zhang, L., Ni, P., Zographos, S.E., Leonidas, D.D., Alexacou, K.M., Gimisis, T., Hayes, J.M., Oikonomakos, N.G. Naturally occurring pentacyclic triterpenes as inhibitors of glycogen phosphorylase: synthesis, structure-activity relationships, and X-ray crystallographic studies. J Med Chem., 51: 3540-54, 2008.

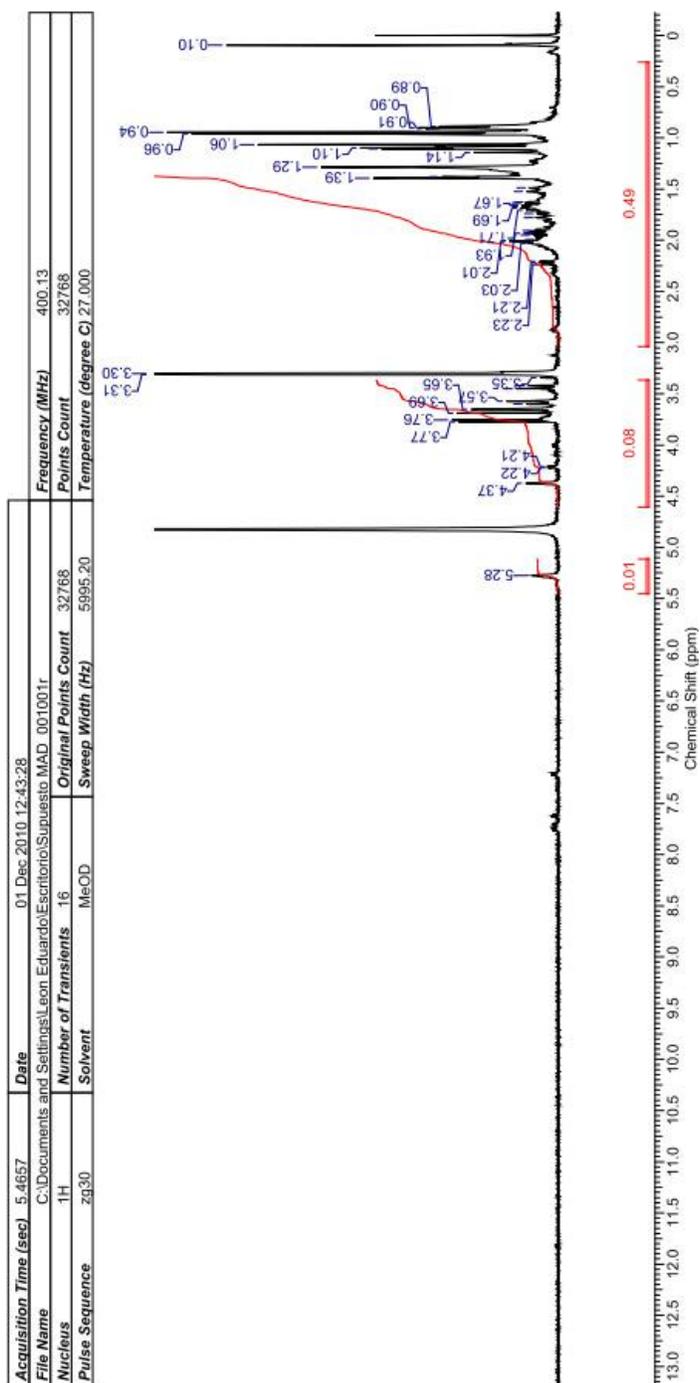
ZIN, S.J., Weiss, R.C. La salud por medio de las plantas medicinales. Séptima edición, Santiago de Chile, Editorial Don Bosco S.A., 1998, pp. 54, 233.

Anexo A: Espectro de masa para U7

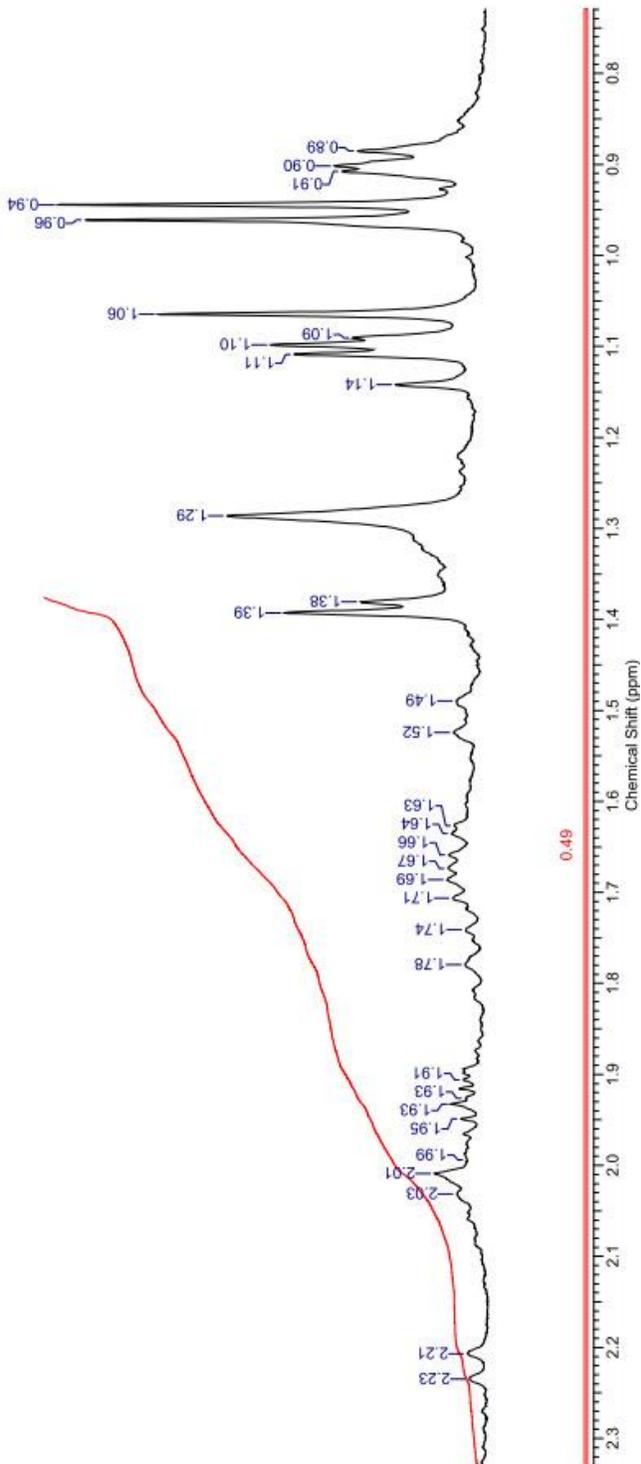


Anexo B: Espectro de RMN de U7 aislado de una fracción rica en sapogeninas triterpénicas provenientes del ETT

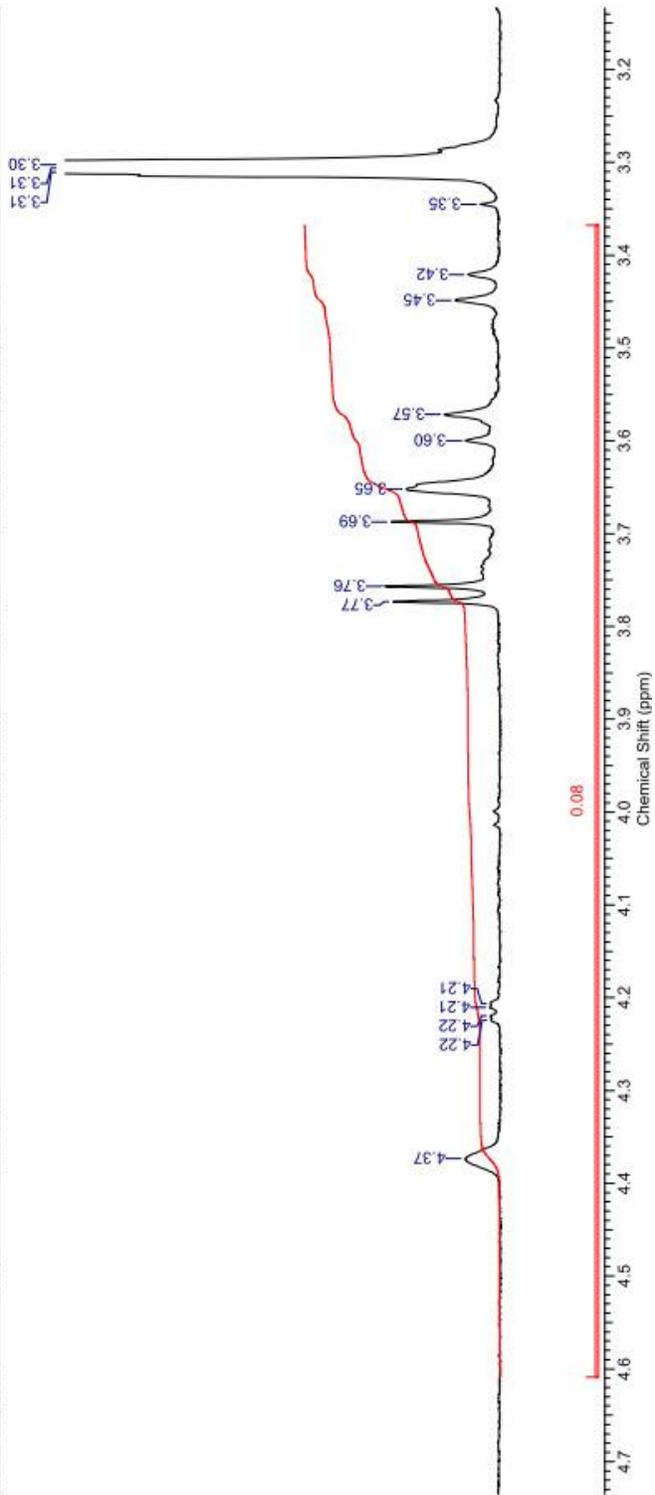
Anexo B₁: Espectro de ¹H



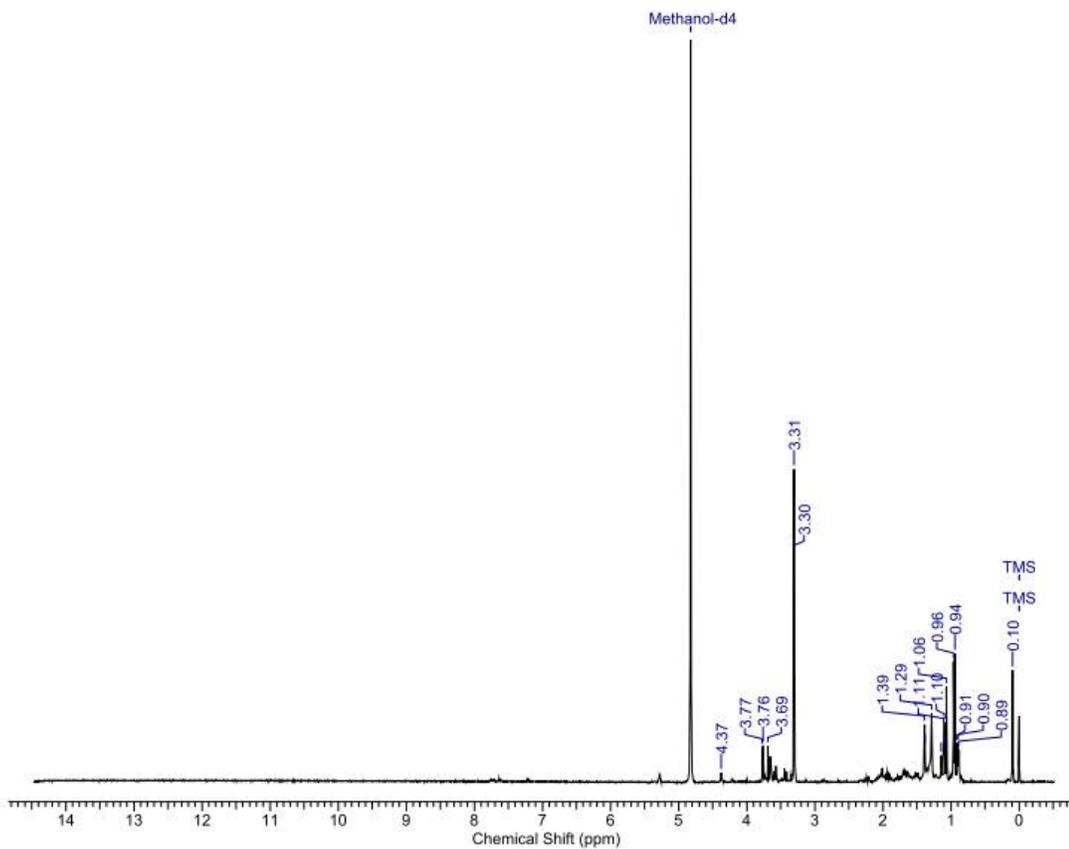
Acquisition Time (sec)	5.4657	Date	01 Dec 2010 12:43:28	Frequency (MHz)	400.13
File Name	C:\Documents and Settings\Leon Eduardo\Escritorio\Supuesto MAD_001001r			Points Count	32768
Nucleus	¹ H	Number of Transients	16	Original Points Count	32768
Pulse Sequence	zg30	Solvent	MeOD	Sweep Width (Hz)	5995.20
				Temperature (degree C)	27.000



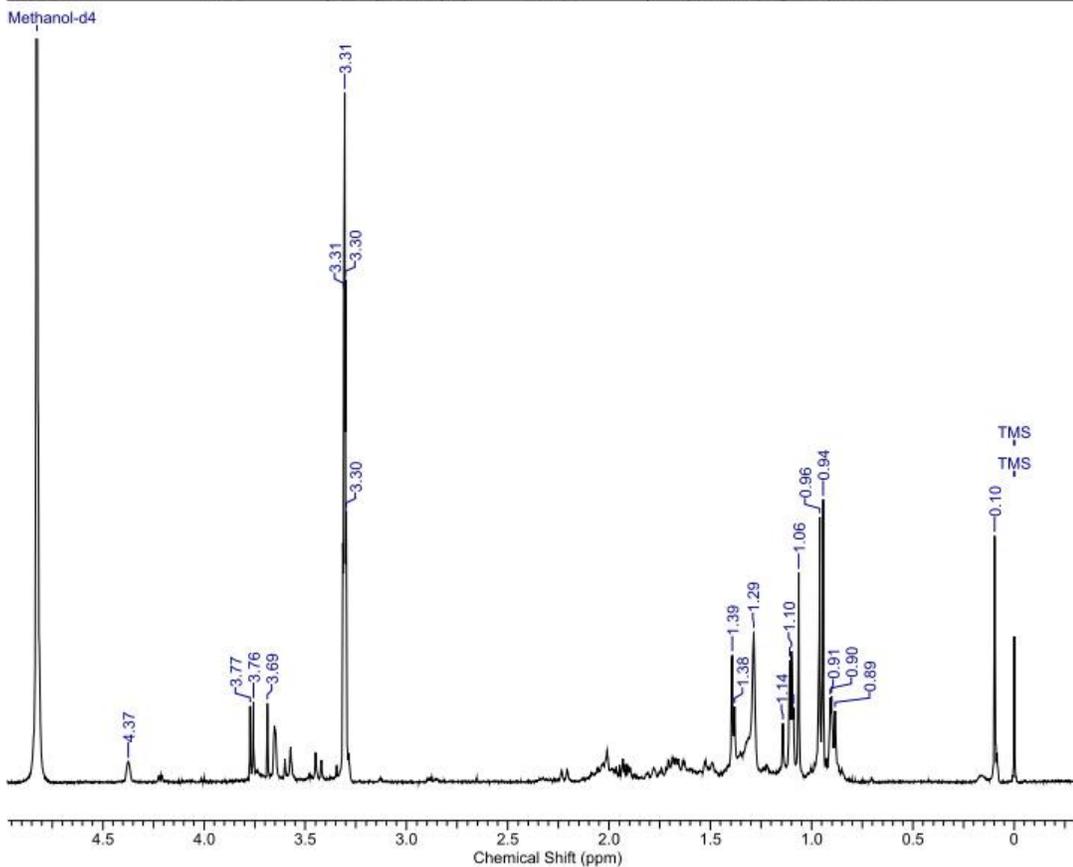
Acquisition Time (sec)	5.4657	Date	01 Dec 2010 12:43:28
File Name	C:\Documents and Settings\Leon Eduardo\Escritorio\Supuesto MAD_001001r		
Nucleus	1H	Number of Transients	16
Pulse Sequence	zg30	Solvent	MeOD
		Sweep Width (Hz)	5895.20
		Frequency (MHz)	400.13
		Points Count	32768
		Temperature (degree C)	27.000



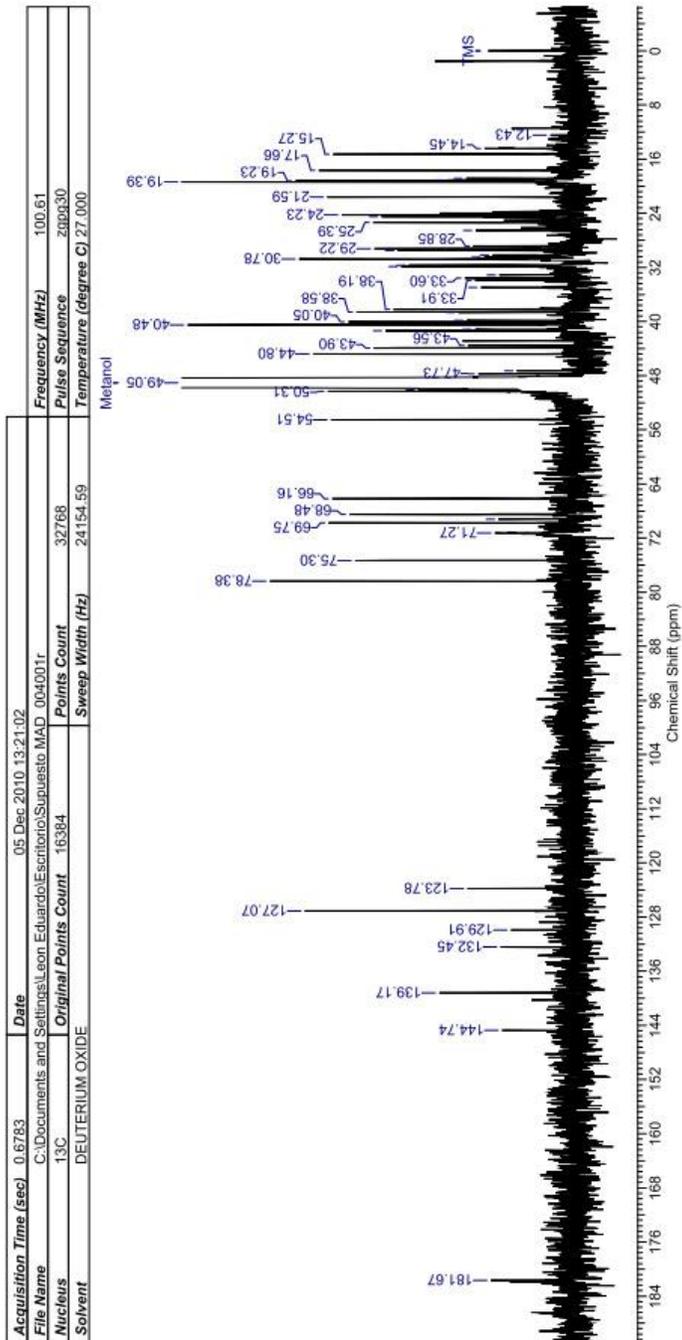
Acquisition Time (sec)	5.4657	Date	01 Dec 2010 17:38:08		
File Name	C:\Documents and Settings\Leon Eduardo\Escritorio\011210-CDLG\011210-CDLG_001000.fid				
Frequency (MHz)	400.13	Nucleus	1H	Number of Transients	16
Original Points Count	32768	Points Count	32768	Pulse Sequence	zg30
Solvent	MeOD	Sweep Width (Hz)	5995.20	Temperature (degree C)	27.000



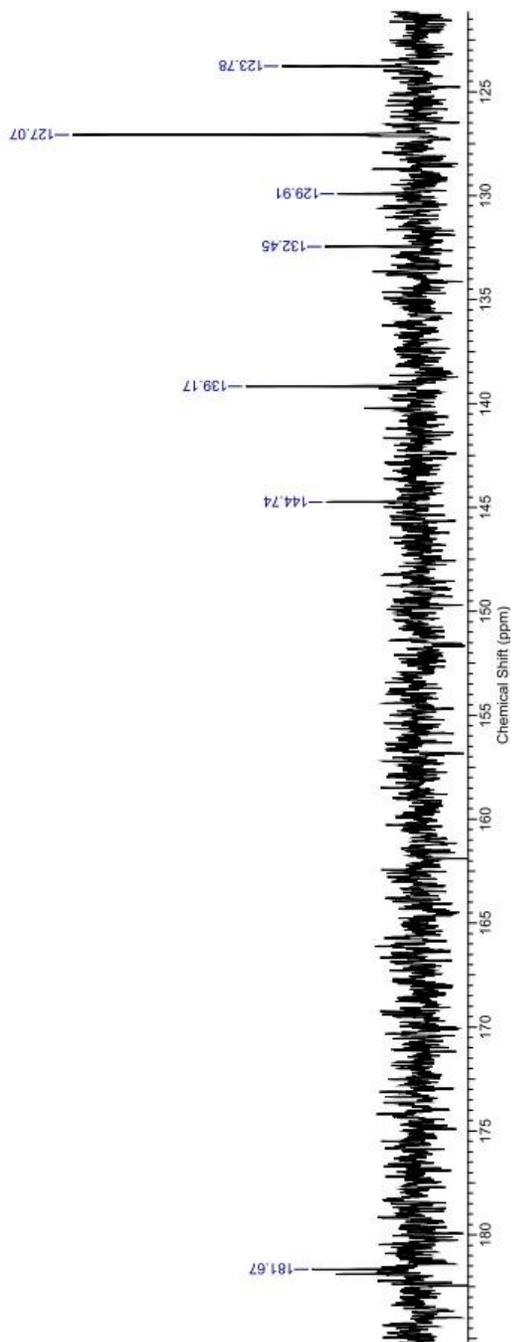
Acquisition Time (sec)	5.4657	Date	01 Dec 2010 17:38:08		
File Name	C:\Documents and Settings\Leon Eduardo\Escritorio\011210-CDLG\011210-CDLG_001000fid				
Frequency (MHz)	400.13	Nucleus	1H	Number of Transients	16
Original Points Count	32768	Points Count	32768	Pulse Sequence	zg30
Solvent	MeOD	Sweep Width (Hz)	5995.20	Temperature (degree C)	27.000



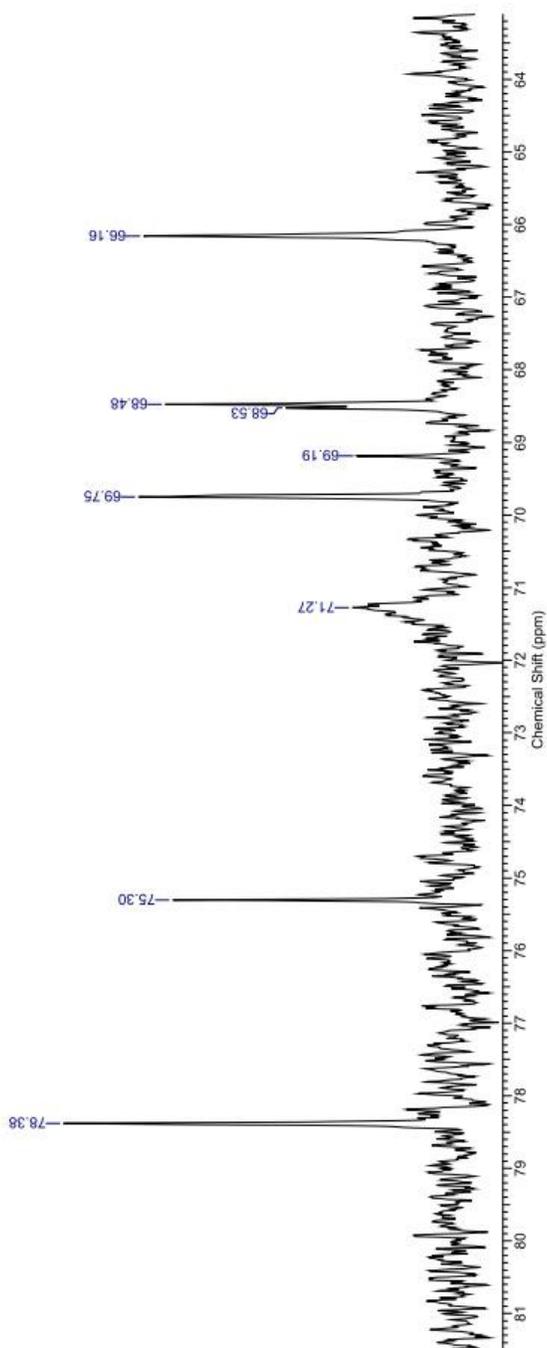
Anexo B₂: Espectro de ¹³C



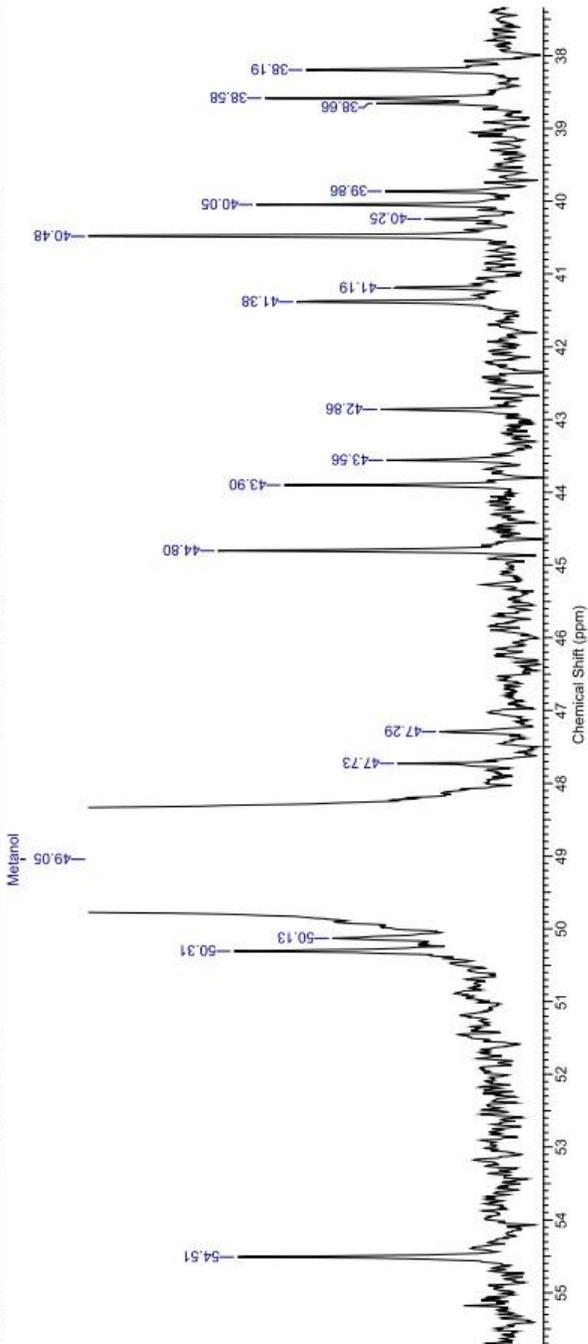
Acquisition Time (sec)	0.6783	Date	05 Dec 2010 13:21:02
File Name	C:\Documents and Settings\Leon Eduardo\Escritorio\Supeasto MAD_040001r		
Nucleus	13C	Original Points Count	16384
Solvent	DEUTERIUM OXIDE	Points Count	32768
		Sweep Width (Hz)	24154.59
		Frequency (MHz)	100.61
		Pulse Sequence	zgpg30
		Temperature (degree C)	27.000



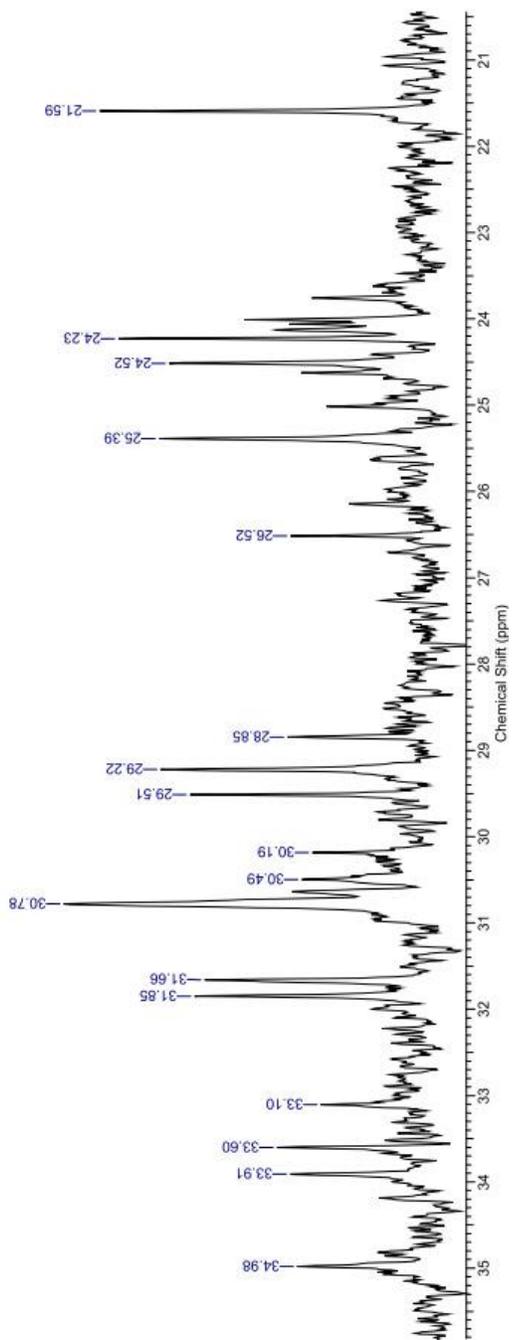
Acquisition Time (sec)	0.6783	Date	05 Dec 2010 13:21:02
File Name	C:\Documents and Settings\Leon Eduardo\Escritorio\Supuesto MAD_004001r		
Nucleus	¹³ C	Original Points Count	16384
Solvent	DEUTERIUM OXIDE	Points Count	32768
		Sweep Width (Hz)	24154.59
		Frequency (MHz)	100.61
		Pulse Sequence	zgpg30
		Temperature (degree C)	27.000



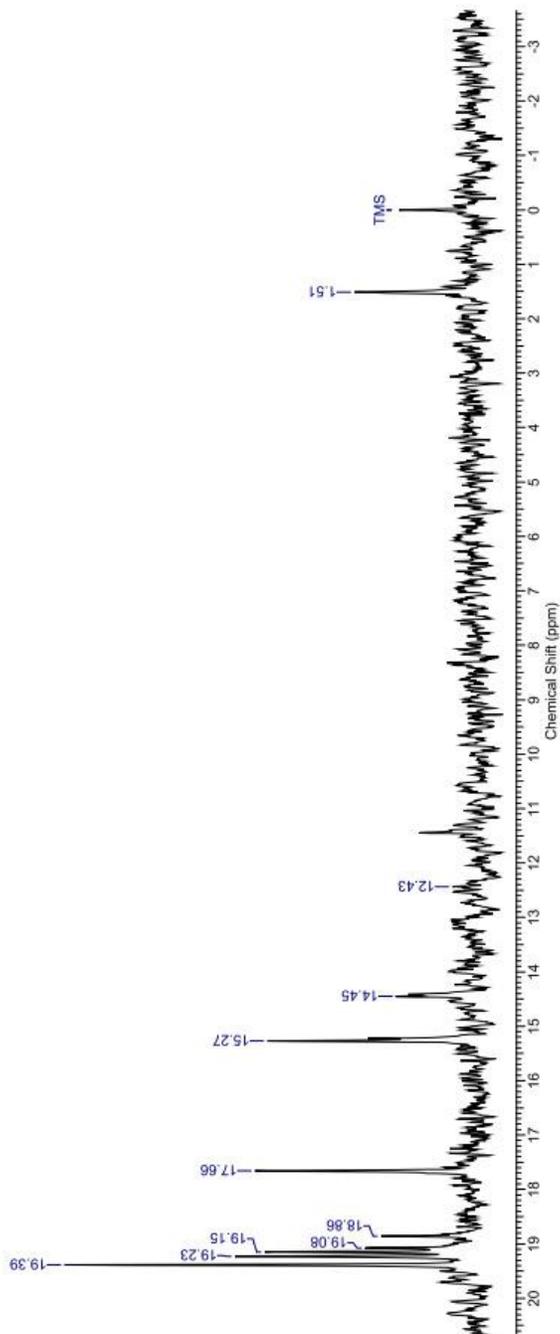
Acquisition Time (sec)	0.6783	Date	05 Dec 2010 13:21:02
File Name	C:\Documents and Settings\Leon Eduardo\Escritorio\Supuesto MAD_0040011		
Nucleus	13C	Original Points Count	16384
Solvent	DEUTERIUM OXIDE	Points Count	32768
		Sweep Width (Hz)	24154.59
		Frequency (MHz)	100.61
		Pulse Sequence	ZPG30
		Temperature (degree C)	27.000



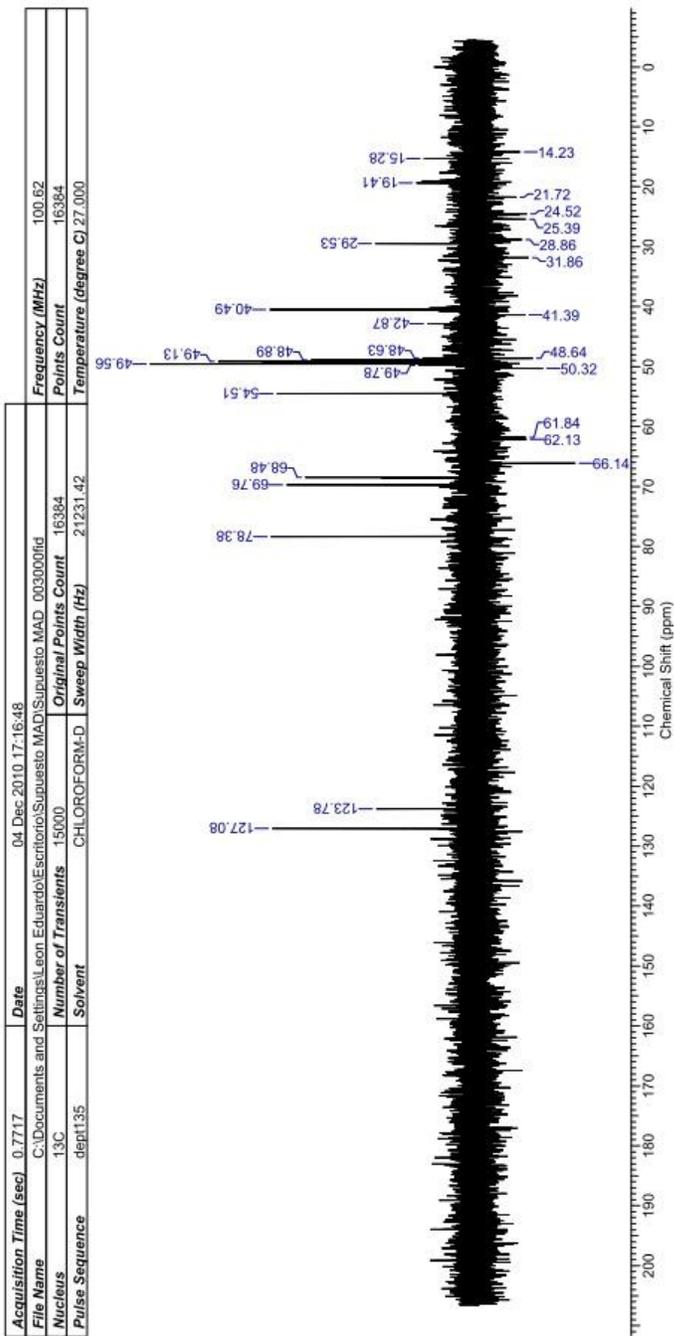
Acquisition Time (sec)	0.6783	Date	05 Dec 2010 13:21:02	Frequency (MHz)	100.61
File Name	C:\Documents and Settings\Leon Eduardo\Escritorio\Supuesto MAD_004001r			Pulse Sequence	zgpg30
Nucleus	¹³ C	Original Points Count	16384	Points Count	32768
Solvent	DEUTERIUM OXIDE			Sweep Width (Hz)	24154.59
				Temperature (degree C)	27.000



Acquisition Time (sec)	0.6783	Date	05 Dec 2010 13:21:02
File Name	C:\Documents and Settings\Leon Eduardo\Escritorio\Supuesto MAD_004001r		
Nucleus	13C	Original Points Count	16384
Solvent	DEUTERIUM OXIDE	Points Count	32768
		Sweep Width (Hz)	24154.59
		Frequency (MHz)	100.61
		Pulse Sequence	zgpg30
		Temperature (degree C)	27.000



Anexo B₃: Espectro DEPT 135



Anexo C: Fotografía Testigo Herbario *Ugni molinae* Turcz



Anexo D: Presentaciones a congresos y jornadas de investigación

V CONGRESO DE QUÍMICOS FARMACÉUTICOS DE LA INDUSTRIA (SOQUIFICH)
27, 28 Y 29 DE SEPTIEMBRE DE 2010 EN EL HOTEL GRAN HYATT, SANTIAGO.

Sapogeninas de un extracto de corteza de *Quillaja saponaria* Mol.: aislamiento, identificación y evaluación de la potencial actividad hipoglicemiante *in vitro*

María José Queupil¹, Carlos Cartagena¹, Maité Rodríguez-Díaz¹, Nicolás Cava¹, Bruce K. Cassels², Carla Delporte¹,

¹Departamento de Química Farmacológica y Toxicológica. Facultad de de Ciencias Químicas y Farmacéuticas. Universidad de Chile. Casilla 233, Santiago, Chile. ²Departamento de Química. Facultad de Ciencias. Universidad de Chile Casilla 653, Santiago, Chile.

INTRODUCCION Y OBJETIVOS

El quillay es un árbol de la zona central de Chile usado desde tiempos precolombinos como detergente. Sus saponinas se utilizan como agentes espumantes y emulsificantes; y en forma más purificada, para la preparación de vacunas y otros productos medicinales. Las saponinas del quillay corresponden a una mezcla compleja de glicósidos y ésteres azucarados de sapogeninas tales como los ácidos: quillaico; equinocístico, 22 β - hidroxiquillaico y fitolacagénico.

El objetivo principal de este trabajo fue aislar las sapogeninas mayoritarias a partir del extracto acuoso de corteza de quillay Ultra Dry 100 Q donado por Natural Response®, cuantificar dichas moléculas por HPLC cuando sea posible y evaluar el producto de hidrólisis del Ultra Dry 100 Q como inhibidor de la glicógeno fosforilasa a (GPa), una enzima muy activa en hiperglicemias.

MATERIALES Y METODOS

El extracto Ultra Dry 100 Q® se hidrolizó con HCl al 18% y calentamiento a reflujo por 2 horas para obtener un producto de hidrólisis (mezcla de sapogeninas) el que fue purificado mediante sucesivas columnas cromatográficas de sílica gel G y Sephadex® LH-20.

Las sapogeninas aisladas fueron caracterizadas mediante espectrometría de masas (MS) y espectroscopía de resonancia magnética nuclear unidimensional y bidimensional (RMN).

El contenido de sapogeninas dentro del producto de hidrólisis fue calculado por HPLC utilizando como patrones las sapogeninas aisladas de una pureza mayor al 95%.

En cuanto a la evaluación inhibitoria de la GPa, se utilizó un método colorimétrico a 620 nm, que se basa en la liberación de fosfato al medio. El producto de hidrólisis fue evaluado y se comparó su actividad inhibitoria con la cafeína, la molécula de referencia en este ensayo.

RESULTADOS

Se consiguió optimizar el rendimiento de obtención del producto de hidrólisis, ya que con la presente metodología se consiguió un 39% de rendimiento, versus un 30% con el método anterior (HCl al 9% y 3 horas de calentamiento a reflujo).

Se aislaron 6 sapogeninas triterpénicas denominadas Qy1, Qy2, Qy3, Qy4, Qy5 y Qy6. Qy1 fue identificada como ácido quillaico, Qy5 como ácido fitolacagénico, mientras que Qy6 se caracterizó como el isómero olean-13(18)-eno del ácido quillaico, un artefacto formado a partir de Qy1 en medio ácido. El resto de las sapogeninas, en tanto, están en proceso de identificación.

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

En el ensayo de inhibición de la glicógeno fosforilasa a (GPa), los resultados demostraron que el producto de hidrólisis fue mucho menos eficaz que la cafeína (16,8% versus 68,4%).

CONCLUSIONES

Se logró optimizar la metodología para obtener el producto de hidrólisis y se lograron aislar 6 sapogeninas, entre las que se destacan el ácido quillaico, fitolacagénico y un isómero del primero.

Mediante HPLC se pudo determinar que el ácido quillaico fue la sapogenina principal dentro del producto de hidrólisis (68,5%), mientras que el ácido fitolacagénico estuvo presente en un 5,0%. Con respecto al ensayo de inhibición de la GPa, el producto de hidrólisis presentó un bajo poder inhibitorio de esta enzima, lo que indicaría que al menos en esta vía, no tendría una actividad hipoglicemiante significativa.

AGRADECIMIENTOS

Proyecto FONDECYT: 1080174, al ISP de Chile por los animales de experimentación y a Natural Response S.A. por una generosa donación de 100 Q.

V CONGRESO DE QUÍMICOS FARMACÉUTICOS DE LA INDUSTRIA (SOQUIFICH)
27, 28 Y 29 DE SEPTIEMBRE DE 2010 EN EL HOTEL GRAN HYATT, SANTIAGO.

Hojas de murtila: Prometedora fuente de sustancias anti-diabéticas

Leon E. Goity*†, M^a José Queupil*, Marcelo Peña*, Lorena García*, Carla Delporte*

* Facultad de Cs. Químicas y Farmacéuticas - Universidad de Chile

† Becario CONICYT

lgoity@ug.uchile.cl

Introducción

Ugni molinae Turcz., especie nativa chilena conocida vulgarmente como murtila o murta, es un arbusto que crece en forma silvestre y abundante desde la VII hasta la X región. Estudios previos realizados en nuestro laboratorio demostraron que las hojas de esta especie son rica fuente de triterpenoides pentacíclicos derivados de los núcleos ursano, oleanano y lupano, a los cuales tanto la literatura como los estudios realizados en el laboratorio han establecido que poseen propiedades: hipoglicemiante, anti-inflamatoria y antioxidante. La asociación de estas tres actividades farmacológicas sería útil en la prevención y tratamiento de la intolerancia a la glucosa y resistencia a la insulina, puesto que no sólo se regularía el metabolismo de glucosa sino que además se disminuirían las complicaciones derivadas de la inflamación crónica sub-clínica y estrés oxidativo, siendo ambos consecuencia de estados hiperglicémicos patológicos.

Objetivos

Determinar para los distintos extractos obtenidos desde las hojas de murtila su actividad inhibitoria sobre la enzima glicógeno fosforilasa a de músculo de conejo (GPa).

Metodología

El material vegetal fue recolectado en la Provincia de Cauquenes (35° 41' S; 71° 40' O) en el mes de abril guardándose un testigo herbario en nuestra facultad. Las hojas se secaron y trituraron para preparar los distintos extractos por maceración hasta total agotamiento con solventes de polaridad creciente obteniéndose los extractos de hexano (HEX), diclorometano (DCM), acetato de etilo (EAE) y etanol (EET). EET en suspensión acuosa fue extraído por partición con acetato de etilo obteniéndose al llevar a sequedad la fracción FACet.

La actividad inhibitoria de los extractos sobre GPa fue determinada midiendo colorimétricamente a 655 nm la liberación de ion fosfato producto de la reacción enzimática en la dirección de síntesis de glicógeno a partir de glucosa-1-fosfato. Cada extracto fue disuelto en DMSO y evaluado a una concentración de 60 µg/mL.

Resultados

Los rendimientos en peso seco de los HEX, DCM, EAE y EET obtenidos correspondieron respectivamente a 1,4; 5,6; 13,7; 22,2 g por 100 g de hoja seca y molida. FACet se obtuvo desde el EET con un rendimiento de 25%.

Los EET, FACet, EAE, DCM y HEX demostraron poseer respectivamente un porcentaje de actividad inhibitoria sobre GPa \pm SEM de 50 \pm 2; 47 \pm 2; 40 \pm 2; 22 \pm 3; 14 \pm 4.

Discusión y Conclusiones

Los EET, FACet y EAE poseen actividad inhibitoria equivalente entre sí y fueron significativamente más activos que los DCM y HEX. Debido a los antecedentes bibliográficos,

parte de la actividad podría ser atribuida a los triterpenoides pentacíclicos presentes en los extractos bioactivos. Los resultados obtenidos otorgan perspectivas en los estudios químico-farmacológicos para esta especie vegetal nativa.

Agradecimientos
Proyecto FONDECYT 110075

XXXII Congreso Anual de la Sociedad de Farmacología de Chile
3 – 6 noviembre de 2010, Valdivia – Chile

**EXTRACTOS DE HOJAS DE *UGNI MOLINAE* (MURTILLA): INHIBIDORES DE GLICÓGENO
FOSFORILASA**

***Ugni molinae* (murtilla) leave extracts: Glycogen phosphorylase inhibitors**

Goñy, L.E.*†; Queupil M.J.*; García, L.*; Cassels, B.K.; Delporte, C.*

Ugni molinae, especie vegetal nativa conocida vulgarmente como murtilla o murta, crece de manera silvestre y abundante desde la VII hasta la X región. Estudios previos realizados en nuestro laboratorio demostraron que las hojas de esta especie son una rica fuente de triterpenoides pentacíclicos derivados de los núcleos ursano, oleanano y lupano, algunos de los cuales presentan propiedades: hipoglicemiante, anti-inflamatoria y antioxidante. La asociación de estas tres actividades farmacológicas sería útil en la prevención y tratamiento de estados hiperglicémicos.

El material vegetal fue recolectado en la Provincia de Cauquenes en el mes de abril y las hojas se secaron y molieron con el objetivo de preparar distintos extractos con distintos solventes de polaridad creciente hasta total agotamiento: extractos de hexano (HEX), diclorometano (EDM), acetato de etilo (EAE) y etanol (EET).

Se determinó el porcentaje de la actividad inhibitoria sobre la enzima glicógeno fosforilasa (% E) a de músculo de conejo (GPa) midiendo por colorimetría (655 nm) la liberación de ion fosfato producto de la reacción enzimática en la dirección de síntesis de glicógeno a partir de glucosa-1-fosfato. Los extractos fueron evaluado a la concentración de 60 µg/mL y el fármaco de referencia, cafeína (10 - 1000 µM), todas las muestra fueron disueltas en DMSO.

Tanto EET como EAE poseen actividad inhibitoria equivalente entre sí (50% E) y fueron significativamente más activos que los DCM (22% E) y HEX (14% E). Debido a los antecedentes bibliográficos, parte de la actividad podría ser atribuida a los triterpenoides pentacíclicos presentes en los extractos bioactivos. Los resultados obtenidos nos permiten concluir que los estudios químico-farmacológicos para esta especie vegetal nativa tienen muchas proyecciones en el ámbito terapéutico.

Agradecimientos
Proyecto FONDECYT 110075
Beca Conicyt AT-24100051

XXXII Congreso Anual de la Sociedad de Farmacología de Chile
3 – 6 noviembre de 2010, Valdivia – Chile

Actividad antioxidante e inhibidora de la glicógeno fosforilasa de extractos provenientes de residuos del proceso industrial del fruto del mango

Gabino Garrido¹, Pamela Chávez¹, María José Queupil², Leon E. Goity², Carla Delporte²

¹ Laboratorio de Productos Naturales Depto. de Química y Farmacia, Facultad de Ciencias, Universidad Católica del Norte, Antofagasta, Chile.

² Laboratorio de Productos Naturales, Departamento de Química Farmacológica y Toxicológica Facultad de Cs. Químicas y Farmacéuticas, Universidad de Chile, Santiago, Chile.

gabinocl@yahoo.com; ggarridog@ucn.cl

El mango (*Mangifera indica* L., Anacardiaceae) constituye uno de los frutos tropicales extensamente cultivados. Estudios previos a partir de extractos de la corteza del árbol han demostrado que estos presentan actividad antioxidante, anti-inflamatoria e inmunomoduladora atribuibles a la presencia, principalmente, de una mezcla de polifenoles, terpenoides y ácidos grasos. Esta combinación de actividades y componentes podrían estar presentes también en diferentes partes desechables del fruto. En este trabajo se determinó la actividad inhibidora de los distintos extractos, obtenidos de la cáscara del fruto del mango de la variedad procedente del Valle de Pica, sobre el estrés oxidativo y la enzima glicógeno fosforilasa a (GPa). El material vegetal fue recolectado (abril 2009) en el mercado La Vega, Antofagasta. Las cáscaras fueron removidas y secadas a 45 °C, trituradas y extraídas hasta total agotamiento, en diferentes disolventes (agua, etanol, metanol y acetona) o sus combinaciones (50 y 80%). La actividad antioxidante fue determinada mediante la reacción con el radical DPPH, la actividad frente a xantina oxidasa y la interacción con el radical superóxido. Estos presentaron actividad antioxidante equivalentes entre sí (> 90%) e inhibieron la GPa (determinada a 655 nm a una concentración de 60 µg/mL) en el orden siguiente: acetona-agua (8:2) > etanol (100%) > acetona-agua (1:1) > etanol-agua (1:1) > metanol-agua (8:2) > metanol-agua (1:1) > agua (100%) en un rango de inhibición de 89,3-4,1% respectivamente. Parte de la actividad podría ser atribuida a carotenoides y antocianinas reportados en dichos extractos. Estos resultados otorgan perspectivas en los estudios químico-farmacológicos para esta variedad de mango que crece en el norte del país pudiendo ser útiles en la prevención y tratamiento de la intolerancia a la glucosa, resistencia a la insulina y disminución de la inflamación, inmunodepresión y estrés oxidativo que derivan de estados hiperglicémicos.

OBTENCIÓN DE UN CRUDO DE SAPONINAS TRITERPÉNICAS DESDE HOJAS DE MURTILLA

Marcelo Peña, Leon Goity, María José Queupil, Pablo Correa, Hugo Díaz, Isabel Petit, Gonzalo Cebrero, Magdalena Ríos, Jessica Bravo y Carla Delporte.

Laboratorio de Productos Naturales. Departamento de Química Farmacológica y Toxicológica
(mcehlod@hotmail.com)

Palabras claves: *Ugni molinae*; antiinflamatorio; glicógeno fosforilasa a.

A partir de las hojas de *Ugni molinae*, Myrtaceae, (n.v. murtilla) fueron obtenidos los extractos seriados de hexano, diclorometano, acetato de etilo y etanol. El extracto etanólico (**EET**) se caracterizó por presentar en un alto porcentaje taninos junto con flavonoides, saponinas y sapogeninas identificadas como ácido asiático y corosólico entre otros.

Objetivo: obtener un crudo de saponinas (**CS**) desde el **EET**.

Metodología: se realizó una extracción por Soxhlet en forma sucesiva de diferentes lotes de 5 g de EET con H₂O, CH₂Cl₂, EtOAc y etanol.

Resultados: fueron obtenidos los sub extractos AET (70%), SDM (3%), SAE (10%) y SET (12%) respectivamente (ver Figura). AET fue extraído por partición de solventes con éter de petróleo: n-butanol: NaOH: 0,05 M (5:1:6) para obtener una fase orgánica (F-Org1 0,8%) y una fase acuosa (F-Acu 1) enriquecida en saponinas y compuestos fenólicos. La F-Acu 1, fue particionada con n-butanol y se obtuvo una fase acuosa 2 (F-Acu 2) la cual retiene taninos, polifenoles y pequeñas cantidades de saponinas y la fase orgánica 2 (F-Org 2). La F-Org 2 fue purificada mediante columnas cromatográficas de Sephadex LH-20 desde la que se obtuvo el **CS**. Mediante una hidrólisis ácida en medio acuoso el CS será hidrolizado con el fin de aislar e identificar las sapogeninas mayoritarias. Tanto el **CS**, producto de hidrólisis y sapogeninas aisladas e identificadas, serán evaluados frente a la glicógeno fosforilasa a e inflamación inducida por ácido araquidónico y un éster del forbol (TPA).

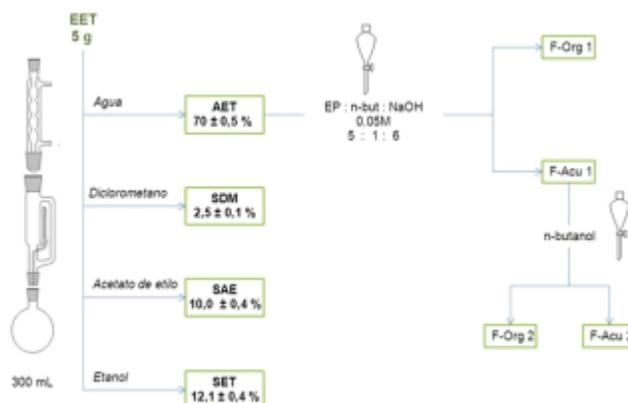


Figura. Esquema de fraccionamiento del **EET** obtenido desde hojas de murtilla

52nd Annual Meeting of the American Society of Pharmacognosy
San Diego, California (30 Julio-3 Agosto 2011)

MADECASSIC ACID IN THE CHILEAN *UGNI MOLINAE*

Leon Goity¹, María José Queupil¹, Daniela Jara¹, Sergio Alegría, Marcelo Peña¹, Carla Delporte¹.

¹Facultad de Cs. Químicas y Farmacéuticas, Universidad de Chile, Santiago, Chile.

Ugni molinae Turcz, is found as a wild shrub along the Chilean southern lands. Its edible berries have been appreciated by locals due to their alimentary value (Fig. 1). Folk medicine has considered its leaves for their use their use to treat different types of pain. This was substantiated by our previous pharmacological studies, which also demonstrated that its leaves represent an important source of pentacyclic triterpenoids. Given the relevance of these findings and an observed pharmacological activity of a leaves ethanol extract (EET), we decided to supplement these studies looking for *in vivo* anti-inflammatory triterpenoids thus complementing the knowledge about the composition of the leaves of *Ugni molinae*. Madecassic acid (MA, Fig. 2) is here reported for the first time for this identified by using spectroscopic techniques, HPLC-ESI-MS/MS and comparative literature studies. The anti-inflammatory activity of EET and MA was evaluated by means of the TPA-induced mouse ear edema model. Observing $60.5 \pm 3.3\%$ of effect for the EET and a dose dependent effect for MA with a maximum effect of $69.8 \pm 6.5\%$ at 0.7 nmol/ear , comparable to $71.7 \pm 11.3\%$, produced by the same dose of indometacina. These results allow us to demonstrate the contribution of MA over the anti-inflammatory activity of EET obtained from *Ugni molinae*.



Fig. 1

Ugni molinae Turcz., Myrtaceae

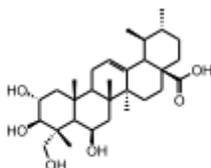


Figure 2

Madecassic acid

XII Congreso Nacional de Estudiantes de Química y Farmacia Santiago, Chile (4 al 7 de Octubre del 2011)



Obtención de un crudo de saponinas de las hojas de *Ugni molinae* y evaluación de su efecto inhibitorio sobre la glicógeno fosforilasa a

Marcelo Peña^a, L.Goity^a, M.J. Queupil^a, P. Zapata^a, I. Petit^a, M.P. Cárcamo^a, Y. Piña^a, Carla Delporte^a
^a Lab. de Productos Naturales, Facultad de Cs. Químicas y Farmacéuticas
Universidad de Chile

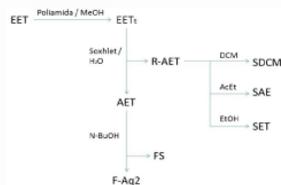
Ugni molinae (Murtilla o Murta) Turcz, Myrtaceae es un arbusto autóctono, que crece principalmente en los faldeos cordilleranos de la zona sur de Chile, donde cobra gran importancia debido al uso de hojas con fines terapéuticos, y también al uso y exportación de sus frutos para la confección de comidas, dulces y licores.

Estudios científicos realizados en el laboratorio, han comprobado la actividad antiinflamatoria y analgésica de sus hojas, lo que confirma lo descrito por la medicina folclórica, la cual describe el uso de infusos en el tratamiento de diversos tipos de dolor. Recientemente, se ha descubierto que algunos compuestos del tipo triterpenoide, pueden inhibir a la enzima glicógeno fosforilasa a, otorgando nuevas perspectivas al estudio de la murtilla.

El estudio del extracto etanólico (EET) de las hojas de murtilla, ha comprobado la presencia de distintos tipos de compuestos como triterpenos (saponinas y sapogeninas), flavonoides, antocianos y una gran cantidad de taninos, la que es una característica importante de la familia de las myrtaceas.



Esquema de obtención del crudo de saponinas (FS)



La obtención del crudo fue realizada mediante la elución con MeOH del EET a través de una columna de poliamida (con MeOH como eluyente) para eliminar los taninos presentes, la solución obtenida fue llevada a sequedad mediante corriente de aire caliente y luego extraída en un equipo Soxhlet con agua para descartar las sapogeninas triterpénicas, finalmente la solución acuosa fue extraída con BuOH, obteniéndose el crudo rico en saponinas.

El crudo fue posteriormente hidrolizado utilizando HCl 2N durante 2 horas, fue filtrado, obteniéndose un polvo café oscuro, denominado FSH.

Cada fracción obtenida fue monitoreada mediante CCF utilizando p-anisaldehído sulfúrico (PAS) como reactivo revelador, y finalmente analizada utilizando CLAE con arreglo de diodos.

Ensayo de inhibición sobre GPa

La actividad inhibitoria sobre la enzima glicógeno fosforilasa a (GPa) de músculo de conejo fue determinada mediante el método descrito por Martin et al. (1998). Mediante este método, y al contrario de lo que ocurre en el organismo, se determina espectrofotométricamente la liberación de fosfato desde glucosa-1-fosfato en la dirección de la síntesis de glicógeno.

Tanto FS como FSH fueron evaluados a dosis de 3 y 5 mg/mL, obteniéndose los resultados de la presente tabla.

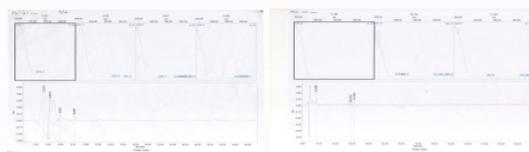
	FS 3 mg/mL	FS 5 mg/mL	FSH 3 mg/mL	FSH 5 mg/mL
Absorbancia Promedio	0.375	0.346	Valores se encontraron fuera de la ley de Beer, el color oscuro de la solución en DMSO no permite leer a cabo las mediciones	
% de Inhibición	51.51	67.56		

El análisis estadístico se llevó a cabo mediante el uso del Software GraphPad Prism versión 5.03. Para determinar la significancia de los datos obtenidos entre sí y con el control negativo, se utilizó el Test de ANOVA.

Referencias

- Aguirre, M.C., Delporte, C., Backhouse, N., Erazo, S., Letelier, M.E., Cassels B.K., Silva, X., Alegria, S., Negrete, R. Topical anti-inflammatory activity of 2 α -hydroxy pentacyclic triterpene acids from the leaves of *Ugni molinae*. Bioorganic & Medicinal Chemistry, 2006, 5673-5677.
- Baker, D.J., Timmons, J.A., Greehalf, P.L. Glycogen phosphorilase inhibition in type 2 diabetes therapy: A systematic evaluation of metabolic and functional effects in rat skeletal muscle. Diabetes, 2005, 54, 2453-2459.
- Delporte, C., Backhouse, N., Inostroza, V., Aguirre, M.C., Peredo, N., Silva, X., Negrete, R., Miranda, H.F. Analgesic activity of *Ugni molinae* (murtilla) in mice models of acute pain. Journal of Ethnopharmacology, 2007, 162-165.
- Montenegro, G. En Chile nuestra flora útil. Guía de plantas de uso apícola, en medicina folclórica, artesanal y ornamental, 241-242. Santiago de Chile: Ediciones Universidad Católica de Chile, 2000.
- Wen, X., Sun, H., Liu, J., Cheng, K., Zhang, P., Zhang, L., Hao, J., Zhang, Lu., Ni, O., Zographos, S.E., Leonidas, D.D., Alexacou, K., Gimisis, T., Hayes, J.M., Oikonomakos, N.G. Naturally occurring pentacyclic triterpenes as inhibitors of glycogen phosphorylase: Synthesis, structure-activity relationships, and X-ray crystallographic studies. Journal of Medicinal Chemistry, 2008, 3540-3554.

AGRADECIMIENTOS: PROYECTO FONDECYT 1100750



Cromatogramas FS y FSH obtenidos por CLAE y un detector con arreglo de diodos a 201 nm

Conclusiones

- El método de obtención de CS resultó ser efectivo y de corta duración (1 día).
- La metodología implementada en la eliminación de taninos resulta de gran importancia en el estudio de plantas de esta familia.
- Mediante estudios por CLAE se determinó al ácido asiático como sapogenina mayoritaria obtenida de la hidrólisis de FS.
- El crudo de saponinas posee efecto inhibitorio sólo a altas dosis, comparado con otros estudios realizados en el laboratorio, en que las sapogeninas aisladas poseen efecto a dosis en el orden de los microgramos.

XXXIII Congreso Anual de la Sociedad de Farmacología de Chile (SOFARCHI).
Olmué, Chile, 16 al 19 de noviembre de 2011

**Metabolitos secundarios responsables de la actividad antiinflamatoria de las
hojas de *Ugni molinae* (murtilla)**

**Secondary metabolites responsible of the anti-inflammatory activity of the *Ugni
molinae* leaves (murtilla)**

Delpor C.*, Queupil M.J.*, García L.*, Barriga A. *, Peña M.*, Aguirre M.C.*, Jara D.*, Goñy L.E.*†

*Facultad de Cs. Químicas y Farmacéuticas - Universidad de Chile; †Becario CONICYT
cdelpor@uchile.cl

Estudios previos realizados en nuestro laboratorio demostraron que las hojas de esta especie autóctona son antiinflamatorias por vía tópica *in vivo*. El modelo utilizado fue la inducción de edema en oreja de ratón por la aplicación de 12-O-tetradecanoilforbol-13-acetato (TPA). Tanto el TPA como los distintos extractos y metabolitos secundarios obtenidos desde las hojas fueron aplicados por vía tópica.

Desde los extractos antiinflamatorios frente a TPA y por un estudio químico bioguiado fueron aislados e identificados por completos estudios espectroscópicos y/o por HPLC-UV-ESI-MSⁿ los ácidos corosólico, asiático, ursólico, oleanólico, madecásico, alfitólico y maslínico, cuyos DE₅₀ como antiinflamatorios frente a TPA fueron 0,19; 0,13; 0,21; 0,65; 0,11; 0,20; 0,27 µmol/ratón, respectivamente. El fármaco de referencia fue la indometacina y su DE₅₀ fue de 0,38 µmol/ratón.

Los ácidos triterpenoides pentacíclicos derivados de los esqueletos ursano, oleanano y lupano son conocidos por su potente actividad antiinflamatoria, ésta es comparable con la de los antiinflamatorios no-esteroidales.

Nuestros resultados demuestran que los ácidos triterpénicos pentacíclicos 2α-hidroxilados (como los ácidos alfitólico, asiático, corosólico, madecásico y maslínico) fueron más potentes que la indometacina.

En el marco del estudio químico es importante destacar que los ácidos madecásico y maslínico no habían sido descritos para *Ugni molinae*

Agradecimientos
Proyecto FONDECYT 1100750
Beca Conicyt AT-24100051