

UNIVERSIDAD DE CHILE

FACULTAD DE CIENCIAS QUIMICAS Y FARMACEUTICAS



**CARACTERIZACIÓN DE LOS COMPUESTOS ACTIVOS
DE *Ugni molinae* (MURTILLA) Y SUS POTENCIALES
EFECTOS HIPOGLICEMIANTES, ANTI-INFLAMATORIOS
Y ANTIOXIDANTES**

**Tesis presentada a la Universidad de Chile
para optar al grado de Doctor en Ciencias Farmacéuticas**

Por:

LEON EDUARDO GOITY VIVAR

Directores de Tesis

**Dra. Carla Delporte Vergara
Dr. Bruce Cassels Niven**

**SANTIAGO - CHILE
JULIO 2013**

**UNIVERSIDAD DE CHILE
FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS Y FARMACÉUTICAS**

**INFORME DE APROBACIÓN
TESIS DE DOCTORADO**

Se informa a la Dirección de Postgrado de la Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas que la Tesis presentada por el candidato:

LEON EDUARDO GOITY VIVAR

Ha sido aprobada por la Comisión Informante de Tesis como requisito para optar al Grado de Doctor en Ciencias Farmacéuticas, en el examen de defensa de Tesis rendido el día 22 de julio de 2013.

Directores de Tesis:

Dra. Carla Delporte _____

Dr. Bruce Cassels _____

Comisión Informante de Tesis:

Dra. María Nella Gai
(Presidenta) _____

Dr. Julio Humberto Dözl _____

Dr. Aurelio San Martín _____

Dr. Henan Pessoa _____

Dr. Rodolfo Lassen _____

*A mi familia,
profesores y amigos*

AGRADECIMIENTOS

La investigación desarrollada en esta tesis se llevó a cabo gracias a la colaboración de distintas personas e instituciones a quienes deseo agradecer en las siguientes líneas:

A mi directora de tesis, Profesora Dra. Carla Delporte Vergara, quién me guió en el desarrollo de esta investigación, aprendiendo de su experiencia competencias tanto docentes como investigativas. Agradezco también su confianza en mis capacidades para llevar a cabo estos estudios y el apoyo brindado para mi desarrollo académico como personal.

A mi director, Profesor Dr. Bruce Cassels Niven, quién ha colaborado importantemente en el desarrollo de mi pensamiento crítico en la investigación y me entregó importantes visiones en el desarrollo de mi tesis.

A los profesores miembros de la comisión evaluadora, quienes desde los inicios de este trabajo aportaron constructivamente a lograr mis objetivos.

Agradezco de manera muy especial a la Dra. Nadine Backhouse Erazo quien por su abnegada vocación docente y pasión científica constituye el modelo que, durante el desarrollo de mis estudios de pre-grado, me instó a seguir mi vocación como académico e investigador.

Al Dr. Luis Cisneros-Zevallos por recibirme en el Plant Bioactives and Bioprocessing Research Lab del Department of Horticultural Sciences de la Texas A&M University y por colaborar con el desarrollo de los estudios en cultivos celulares.

Al Bioquímico Freddy Ibañez por guiarme en el aprendizaje de los estudios en modelos celulares.

A la Unidad de Pruebas Biológicas del Instituto de Salud Pública de Chile por facilitar los animales de experimentación.

A la Comisión Nacional de Investigación Científica y Tecnológica por financiar mis estudios de Doctorado y la investigación realizada mediante el Proyecto FONDECYT 1100750 y la Beca de Apoyo de Tesis AT-24100051.

A la Comisión Fulbright de Chile por otorgarme la Beca de Pasantía Doctoral.

A mi grupo de compañeros del Laboratorio de Productos Naturales por el apoyo otorgado durante el desarrollo de mi tesis.

Agradezco a mi familia por apoyarme en las decisiones de vida que he tomado y por apoyarme de manera incondicional.

Deseo agradecer de manera particular a Camilo Torres e Isabel Mora por haberme alentado en las etapas críticas de mi formación, entregándome su apoyo permanente e incondicional amistad y compañía. Y a mis colegas y amigos Pamela Nahum y Javier Morales por acompañarme desde los inicios de mi formación profesional hasta el día de hoy.

Finalmente deseo agradecer al consejo académico del Departamento de Ciencias Farmacéuticas de la Universidad Católica del Norte, quienes me han otorgado la importante oportunidad de iniciar mis funciones como formador de nuevos profesionales y me apoyaron en los últimos momentos de este proceso.

FINANCIAMIENTO

La investigación de esta tesis fue financiada por:

Proyecto FONDECYT 1100750

Beca CONICYT de Doctorado Nacional

Beca CONICYT de Apoyo de Tesis AT-24100051

Beca Fulbright de pasantía doctoral

TABLA DE CONTENIDOS

AGRADECIMIENTOS	IV
FINANCIAMIENTO	VI
TABLA DE CONTENIDOS	VII
TABLA DE ABREVIATURAS	XII
ÍNDICE DE TABLAS	XIV
ÍNDICE DE FIGURAS	XVI
RESUMEN	1
ABSTRACT	2
I. INTRODUCCIÓN	2
1. Antecedentes de la especie	2
1.1. Clasificación taxonómica (Montenegro, 2000)	2
1.2. Descripción botánica (Huxley y cols., 1999)	3
1.4. Antecedentes de uso tradicional y etnofarmacológicos	4
1.5. Estudios previos	5
1.5.1. Estudios químicos previos	5
1.5.2. Estudios farmacológicos previos	6
2. Síndrome metabólico e inflamación	8
3. Síndrome metabólico y estrés oxidativo	9
II. HIPÓTESIS	11
III. OBJETIVOS	12
1. Objetivo general	12
2. Objetivos específicos	12
IV. MATERIALES Y MÉTODOS	13
1. Material vegetal	13
2. Estudios químicos	13
2.1. Extracción	13

2.1.1. Obtención de extractos seriados de <i>U. molinae</i>	13
2.1.2. Obtención de una fracción rica en triterpenoides desde el EET.....	15
2.2. Aislamiento de metabolitos secundarios desde los extractos bioactivos mediante columna cromatográfica, seguimiento mediante cromatografía en capa fina e identificación por resonancia magnética nuclear	17
2.2.1. Fraccionamiento por columna cromatográfica abierta (CC)	17
2.2.2. Seguimiento mediante cromatografía en capa fina (c.c.f.)	17
2.2.3. Reactivos reveladores de rociado para c.c.f.....	17
2.2.4. Identificación por espectrometría de resonancia magnética nuclear (RMN).....	18
2.3. Caracterización de los extractos de <i>U. molinae</i> mediante cromatografía de líquidos de alta eficiencia acoplada a detección por UV y espectrometría de masas por ionización por electro-spray en tándem (CLAE-UV-ESI-MS/MS)	19
2.4. Estandarización química de extractos de <i>U. molinae</i> por cromatografía de líquidos de alta eficiencia	20
2.4.1. Valoración de los ácidos madecásico, asiático, maslínico, corosólico y alfitólico .	21
2.4.2. Valoración de los ácidos betulínico, ursólico y oleanólico	21
2.5. Determinación de la cantidad de fenoles totales mediante la reacción de Folin-Ciocalteu.....	22
3. Estudios farmacológicos.....	23
3.1. Estudios <i>in vivo</i>	23
3.1.1. Animales de experimentación	23
3.1.2. Determinación de la actividad anti-inflamatoria tópica	23
3.1.3. Análisis estadístico.....	24
3.2. Evaluación de las actividades anti-inflamatoria, antioxidante y anti-adipogénica en modelos celulares.....	25
3.2.1. Metodología general	25
3.2.2. Determinación del nivel de especies reactivas de oxígeno intracelular en macrófagos y células pancreáticas estimuladas con TNF- α	29
3.2.3. Evaluación de la acumulación de triglicéridos en adipocitos.....	31
3.2.4. Evaluación del efecto de las muestras sobre la liberación de IL-6 desde adipocitos estimulados con TNF- α	33

3.3. Evaluación del efecto de las muestras sobre la actividad de catalasa y xantina oxidasa.....	35
3.3.1. Extracción enzimática	35
3.3.2. Determinación de la actividad enzimática.....	35
3.4. Evaluación del efecto de los extractos de <i>U. molinae</i> sobre la actividad de la glicógeno fosforilasa a.....	38
V. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	39
1. Estudios químicos	39
1.1. Extracción	39
1.1.1. Obtención de extractos seriados y sus rendimientos	39
1.1.2. Obtención de una fracción rica en triterpenoides desde el EET.....	40
1.2. Fraccionamiento en columna cromatográfica abierta (CC).....	44
1.2.1. Fraccionamiento en CC de SAE	44
1.2.2. Fraccionamiento en CC de EAE	46
1.3. Caracterización de los extractos de <i>U. molinae</i> mediante cromatografía de líquidos de alta eficiencia acoplada a detección por UV y espectrometría de masas con ionización por electro-spray en tándem (CLAE-UV-ESI-MS/MS).....	48
1.3.1. Análisis por CLAE-UV-ESI-MS/MS del ácido asiático	49
1.3.2. Análisis por CLAE-UV-ESI-MS/MS del ácido alfitólico	50
1.3.3. Análisis por CLAE-UV-ESI-MS/MS del ácido corosólico	51
1.3.4. Análisis por CLAE-UV-ESI-MS/MS del ácido oleanólico	51
1.3.5. Análisis por CLAE-UV-ESI-MS/MS de la co-elución de los ácidos oleanólico y ursólico	52
1.3.6. Caracterización del EAE, EET y SAE por CLAE-UV-ESI-MS/MS	54
1.3.7. Caracterización por CLAE-UV-ESI-MS/MS de SAE y EET	55
1.4. Estandarización química de extractos de <i>U. molinae</i> por cromatografía de líquidos de alta eficiencia	58
1.5. Determinación de la cantidad de fenoles totales mediante la reacción de Folin-Ciocalteu.....	63
2. Estudios farmacológicos.....	65
2.1. Evaluación de la actividad anti-inflamatoria tópica.....	65

2.2. Evaluación de las actividades anti-inflamatoria, antioxidante y anti-adipogénica en modelos celulares.....	69
2.2.1. Viabilidad celular	69
2.2.2. Determinación del nivel intracelular de especies reactivas de oxígeno en macrófagos RAW 264.7 y células pancreáticas β -TC-6 estimuladas con TNF- α	74
2.2.3. Evaluación de la acumulación de triglicéridos en adipocitos.....	84
2.2.4. Evaluación del efecto de las muestras sobre la liberación de IL-6 desde adipocitos estimulados con TNF- α	89
2.3. Evaluación del efecto de las muestras sobre la actividad de las enzimas catalasa y xantina oxidasa.....	92
2.4. Evaluación del efecto de los extractos de <i>U. molinae</i> sobre la actividad de la glicógeno fosforilasa a (GPα)	96
VI. PROYECCIONES	98
VII. CONCLUSIONES	99
ANEXOS	102
Anexo 1: Espectros de RMN del compuesto U7 (ácido madecásico).....	102
A1.1. ^1H -RMN.....	102
A1.2. ^{13}C -RMN de ácido madecásico patrón (A) y muestra del compuesto U7 (B) en metanol- <i>d</i> 4	103
A1.3. DEPT-135 de ácido madecásico patrón (A) y muestra del compuesto U7 (B) en metanol- <i>d</i> 4	104
A1.4. ^{13}C -RMN (ampliado) de ácido madecásico patrón (A) y muestra del compuesto U7 (B) en metanol- <i>d</i> 4.....	105
Anexo 2: Espectros de masas por ionización por electro-spray de estándares de triterpenoides pentacíclicos.....	106
A2.1. Espectros de masas por ionización por electro-spray de ácido asiático	106
A2.2. Espectros de masas por ionización por electro-spray de ácido alfitólico	107
A2.3. Espectros de masas por ionización por electro-spray de ácido corosólico	108

A2.4. Espectros de masas por ionización por electro-spray de ácido oleanólico.....	109
A2.5. Espectros de masas por ionización por electro-spray de la co-elución de los ácidos oleanólico y ursólico.....	110
Anexo 3: Espectros de masas por ionización por electro-spray de cada pico de los cromatogramas por CLAE-UV para EAE, SAE y EET (Figura 22)	111
A3.1. Espectros de masas por ionización por electro-spray del pico 1.....	111
A3.2. Espectros de masas por ionización por electro-spray del pico 2.....	112
A3.3. Espectros de masas por ionización por electro-spray del pico 3.....	113
A3.4. Espectros de masas por ionización por electro-spray del pico 4.....	114
A3.5. Espectros de masas por ionización por electro-spray del pico 5.....	115
A3.6. Espectros de masas por ionización por electro-spray del pico 6.....	116
A3.7. Espectros de masas por ionización por electro-spray del pico 7.....	117
A3.8. Espectros de masas por ionización por electro-spray del pico 8.....	118
A3.9. Espectros de masas por ionización por electro-spray del pico 9.....	119
Anexo 4: Curvas de calibración de CLAE-DAD para los patrones primarios de los triterpenoides pentacíclicos presentes en los extractos de <i>U. molinae</i>	120
Anexo 5: Curva de calibración de ácido gálico para la determinación de la cantidad de fenoles totales mediante la reacción de Folin-Ciocalteu	121
VII. REFERENCIAS.....	123

TABLA DE ABREVIATURAS

3T3-L1	Fibroblastos embrionarios de ratón (línea celular)
AET	Fracción extraída con agua de EET mediante un aparato de Soxhlet
AT	Actividad anti-inflamatoria tópica
ATCC	American Type Culture Collection
c.c.f.	Cromatografía en capa fina
CC	Columna cromatográfica abierta
CLAE	Cromatografía de líquidos de alta eficiencia
CLAE-DAD	Cromatografía de líquidos de alta eficiencia acoplada a detector UV con arreglo de fotodiodos
CLAE-UV-ESI-MS ⁿ	Cromatografía de líquidos de alta eficiencia acoplada a detector UV y de espectrometría de masa por ionización de electro-spray en tándem.
DCF	Diclorofluoresceína
DCFH-DA	Diacetato de 2',7'-diclorofluoresceína
DMEM	Medio de cultivo de Eagle modificado de Dulbecco
DMEM a.g.	Medio de cultivo de Eagle modificado de Dulbecco alto en glucosa
EAE	Extracto seriado obtenido con acetato de etilo desde hojas de <i>U. molinae</i>
EDCM	Extracto seriado obtenido con diclorometano desde hojas de <i>U. molinae</i>
EET	Extracto seriado etanólico de hojas de <i>U. molinae</i>
EGTA	Ácido etilenglicol tetraacético
EH	Extracto seriado obtenido con hexano desde hojas de <i>U. molinae</i>
ELISA	Ensayo de inmunoadsorción ligado a enzimas
EROic	Especies reactivas de oxígeno intracelulares
FHC	Cadena pesada de ferritina
FR-18	Gel de sílice para fase reversa, octadecilsilanizada

GPa	Glicógeno fosforilasa a
HEPES	Ácido 4-(2-hidroxietil)-piperacín-1-il-etanosulfónico
i.p.	Intraperitoneal
IBMX	3-isobutil-1-metilxantina
IL-6	Interleuquina 6
LPS	Lipopolisacárido
MnSOD	Superóxido dismutasa dependiente de manganeso
MTS	Sal de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-5-(3-carboximetoxifenil)-2-(4-sulfofenil)-2 <i>H</i> -tetrazolio
<i>m/z</i>	Relación de masa sobre carga
p.o.	<i>per os</i>
PAS	p-anisaldehído-sulfúrico
PMS	Metasulfato de fenacina
RAW 264.7	Macrófagos de ascitis de ratón (línea celular)
RFC	Reactivo de Folin-Ciocalteu
RMN	Resonancia magnética nuclear
SAE	Fracción extraída con acetato de etilo de EET mediante un aparato de Soxhlet
SAE	Fracción rica en triterpenoides obtenida desde el EET
SDM	Fracción extraída con diclorometano de EET mediante un aparato de Soxhlet
SEM	Error estándar de la media
SFB	Suero fetal bovino
SOD	Superóxido dismutasa
TMS	Tetrametilsilano
TNF- α	Factor de necrosis tumoral α
TPA	13-acetato de 12-O-tetradecanoilforbol
XO	Xantina oxidasa
β -TC-6	Células beta de insulinoma pancreático (línea celular)

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1: Efectos analgésicos de extractos de hojas de <i>U. molinae</i> (Delporte y cols., 2007)	7
Tabla 2: Sistema de gradiente para la caracterización por CLAE-UV-ESI-MS ⁿ de extractos de <i>U. molinae</i>	19
Tabla 3: Rendimiento del proceso de extracción de las hojas de <i>Ugni molinae</i>	39
Tabla 4: Desplazamientos químicos de RMN- ¹³ C de U7, ácido madecásico patrón, datos de bibliografía para ácido madecásico y una estimación <i>in silico</i> para ácido madecásico.	45
Tabla 5: Fraccionamiento de EAE para la obtención de fracciones crudas de triterpenoides pentacíclicos	46
Tabla 6: Tabla de iones MS ¹ y de fragmentos MS ² de [M-H] ⁻ de distintos estándares de triterpenoides pentacíclicos, obtenidos por CLAE-UV-ESI-MS/MS	53
Tabla 7: Tabla de iones MS ¹ y de fragmentos MS ² de [M-H] ⁻ de los distintos compuestos presentes en el cromatograma por CLAE-UV de EAE	54
Tabla 8: Curvas de calibración para los patrones primarios de ácidos madecásico, asiático, maslínico, betulínico, ursólico y oleanólico.....	58
Tabla 9: Estandarización química de EET, SAE y EAE en sus principales triterpenoides pentacíclicos.....	61
Tabla 10: Tabla dosis-efecto de la actividad anti-inflamatoria tópica de ácido madecásico e indometacina en modelo de edema de oreja de ratón inducido por TPA	65
Tabla 11: Porcentaje de disminución de EROic ± SEM en células RAW 264.1 estimuladas con TNF- α y tratadas con SAE y EAE 1 μM y 10 μM	75
Tabla 12: Porcentaje de disminución de EROic inducido en células RAW 264.1 por TNF-α 2 ng/mL y tratadas con triterpenoides o fármacos de referencia.....	77
Tabla 13: Porcentaje de disminución de EROic ± SEM en células β-TC-6 estimuladas con TNF-α y tratadas con SAE y EAE 1 μM y 10 μM.....	80
Tabla 14: Porcentaje de disminución de EROic inducidas en células β-TC-6 por TNF-α (2 ng/mL) y tratadas con triterpenoides o fármacos de referencia.....	83
Tabla 15: Concentración de triterpenoides en EAE y SAE 10 μg/mL	85

Tabla 16: Porcentaje de acumulación de triglicéridos en adipocitos maduros expuestos a TNF- α (2 ng/mL) y tratados con triterpenoides pentacíclicos por 24 horas.....	87
Tabla 17: Cantidad de IL-6 liberada por adipocitos maduros estimulados con TNF- α en presencia de triterpenoides pentacíclicos y fármaco de referencia	90
Tabla 18: Efecto inhibitorio de la liberación de IL-6 desde adipocitos estimulados con TNF- α de los ácidos madecásico, corosólico y alfitólico	91
Tabla 19: Efecto inhibitorio de triterpenoides pentacíclicos sobre la xantina oxidasa (XO).....	94
Tabla 20: Efecto inhibitorio del EAE y SAE sobre xantina oxidasa (XO)	94
Tabla 21: Concentraciones molares de los triterpenoides pentacíclicos presentes en SAE y EAE 1 y 10 μ g/mL.....	95
Tabla 22: Valores de CI_{50} frente a GP α de los triterpenoides presentes en las hojas de <i>U. molinae</i> y las concentraciones molares de los triterpenoides pentacíclicos presentes en EAE, EET y SAE a 60 μ g/mL.	97

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1: <i>Ugni molinae</i> Turcz., Myrtaceae	3
Figura 2: Triterpenoides pentacíclicos previamente identificados en las hojas de <i>U. molinae</i> (Aguirre y cols., 2006)	5
Figura 3: Proceso de extracción seriada de hojas de <i>U. molinae</i>	14
Figura 4: Esquema de extracción líquido-líquido del EET por reparto entre solventes.	15
Figura 5: Esquema de extracción sólido-líquido del EET con aparato extractor de Soxhlet	16
Figura 6: Micrografías de las líneas celulares empleadas (ATCC).....	26
Figura 7: Reacción de reducción de MTS a formazán soluble en medio de cultivo	27
Figura 8: Detección de cantidad de EROic mediante el método de fluorescencia DCFH-DA/DCF.....	29
Figura 9: Esquema del tratamiento de la línea celular para la determinación de EROic en macrófagos y células pancreáticas estimuladas con TNF- α	30
Figura 10: Esquema del tratamiento de la línea celular para la determinación de la acumulación de triglicéridos en células 3T3-L1 en presencia de las muestras a partir del inicio de la diferenciación de las células.....	32
Figura 11: Esquema del tratamiento de la línea celular para la determinación de la acumulación de triglicéridos y liberación de IL-6 en células 3T3-L1 estimuladas con TNF- α (2 ng/mL).....	34
Figura 12: Esquema del ensayo de determinación de la actividad de la XO	36
Figura 13: Cromatografía en capa fina de FAcet y FBut, productos de la extracción del EET por reparto entre solventes y comparación con los distintos extractos.....	41
Figura 14: Esquema de extracción del EET mediante un aparato de Soxhlet y los rendimientos del proceso.....	42
Figura 15: c.c.f comparativa de los distintos extractos de <i>U. molinae</i> y patrones.....	43
Figura 16: Ácido madecásico.....	44
Figura 17: Ruta de fragmentación ESI-MS propuesta para el [M-H] ⁻ del ácido asiático	49
Figura 18: Ruta de fragmentación ESI-MS propuesta para el [M-H] ⁻ de ácido alfitólico	50
Figura 19: Ruta de fragmentación ESI-MS propuesta para [M-H] ⁻ ácido corosólico	51

Figura 20: Ruta de fragmentación ESI-MS propuesta para los [M-H] ⁺ de los ácidos oleanólico (R ₁ : H y R ₂ : CH ₃) y ursólico (R ₁ : CH ₃ y R ₂ : H).....	52
Figura 21: Ácidos corosólico (A) y maslínico (B)	55
Figura 22: Cromatogramas por CLAE-UV a 201 nm de EAE 3 mg/mL (A); EET 10 mg/mL (B) y SAE 3 mg/mL.	56
Figura 23: Ruta de fragmentación ESI-MS propuesta para el ácido madecásico.....	57
Figura 24: Cromatogramas por CLAE-DAD 201 nm de EAE 5 mg/mL (A), EET 10 mg/mL (B) y SAE 5 mg/mL (C).	59
Figura 25: Cromatogramas por CLAE-DAD 201 nm de EAE 5 mg/mL (A), EET 10 mg/mL (B) y SAE 5 mg/mL (C). 7: ácido betulínico; 8: mezcla de los ácidos oleanólico y ursólico.	60
Figura 26: Estandarización química de EET, SAE y EAE en sus principales triterpenoides pentacíclicos.	61
Figura 27: Co-elución por CLAE de los ácidos oleanólico (36,6 min) y ursólico (37,9 min) EAE (5 mg/mL).	62
Figura 28: Cantidad de fenoles totales en EET, SAE y EAE de <i>U. molinae</i> expresados como mg de ácido gálico por g de extracto seco	63
Figura 29: Efecto anti-inflamatorio tópico del EAE, SAE y EET a una dosis de 1 mg en modelo de edema de oreja de ratón inducido por TPA.	66
Figura 30 Estructuras de los ácidos ursólico, corosólico, asiático, madecásico, oleanólico, maslínico, betulínico y alfitólico y sus correspondientes DE ₅₀ frente al modelo de inflamación de oreja de ratón inducida por TPA (Aguirre y cols., 2006; Banno y cols., 2005; Goity y cols., 2013)	68
Figura 31: Viabilidad de células RAW 264.7 expuestas durante 24 horas a cuatro concentraciones distintas de triterpenoides pentacíclicos (0,1 – 100 µM) (A) y de los extractos EAE y SAE (0,1 – 100 µg/mL) (B).	70
Figura 32: Viabilidad de células RAW 264.7 expuestas durante 48 horas a cuatro concentraciones distintas de triterpenoides pentacíclicos (0,1 – 100 µM) (A) y de los extractos EAE y SAE (0,1 – 100 µg/mL) (B).	70
Figura 33: Viabilidad de células 3T3-L1 expuestas durante 24 horas a cuatro concentraciones distintas de triterpenoides pentacíclicos (0,1 – 100 µM) (A) y de los extractos EAE y SAE (0,1 – 100 µg/mL) (B).	71

Figura 34: Viabilidad de células 3T3-L1 expuestas durante 48 horas a cuatro concentraciones distintas de triterpenoides pentacíclicos (0,1 – 100 μ M) (A) y de los extractos EAE y SAE (0,1 – 100 μ g/mL) (B).....	71
Figura 35: Viabilidad de células β -TC-6 expuestas durante 24 horas a cuatro concentraciones distintas de triterpenoides pentacíclicos (0,1 – 100 μ M) (A) y de los extractos EAE y SAE (0,1 – 100 μ g/mL) (B).....	73
Figura 36: Nivel promedio de EROic en células RAW 264.1 inducidas con TNF- α (2 ng/mL) durante noventa min y tratadas con EAE y SAE a dos concentraciones (n = 6).....	75
Figura 37: Nivel promedio de EROic en células RAW 264.1 inducidas con TNF- α (2 ng/mL) y tratadas con triterpenoides y fármacos de referencia a dos concentraciones (n = 6).	76
Figura 38: Porcentaje de disminución de EROic inducido en células RAW 264.1 por TNF- α 2 ng/mL y tratadas con triterpenoides o fármacos de referencia a dos concentraciones por dos horas posteriores a la inducción (n = 6).....	77
Figura 39: Viabilidad de células RAW 264.7 expuestas durante 48 horas a cuatro concentraciones distintas de los ácidos ursólico y oleanólico.	79
Figura 40: Nivel de EROic generadas en células β -TC-6 luego de ser inducidas con TNF- α (2 ng/mL) durante noventa minutos y tratadas con EAE y SAE a dos concentraciones por dos horas posteriores a la inducción.	81
Figura 41: Nivel de EROic generadas en células β -TC-6 luego de ser inducidas con TNF- α (2 ng/mL) durante noventa minutos y tratadas con triterpenoides o fármacos de referencia a dos concentraciones por dos horas posteriores a la inducción (n = 6).	82
Figura 42: Disminución de EROic inducidas en células β -TC-6 por TNF- α (2 ng/mL) y tratadas con triterpenoides o fármacos de referencia a dos concentraciones por dos horas posteriores a la inducción (n = 6).	82
Figura 43: Acumulación de triglicéridos en células 3T3-L1 diferenciadas a adipocitos en presencia de EAE y SAE a una concentración de 10 μ g/mL (A) y en presencia de triterpenoides pentacíclicos a una concentración de 10 μ M (B).	84

Figura 44: Acumulación de triglicéridos en adipocitos maduros expuestos a TNF- α (2 ng/mL) y tratados con SAE y EAE (A) y con triterpenoides pentacíclicos (B) por 24 horas	87
Figura 45: Ácidos asiático y madecásico	88
Figura 46: Cantidad de IL-6 liberada por adipocitos maduros estimulados con TNF- α en presencia de SAE	89
Figura 47: Cantidad de IL-6 liberada por adipocitos maduros estimulados con TNF- α en presencia de triterpenoides pentacíclicos y fármaco de referencia (α -tocoferol). ..	90
Figura 48: Efecto de SAE, EAE y triterpenoides sobre la actividad enzimática de la catalasa	92
Figura 49: % Actividad de la xantina oxidasa (XO) frente a triterpenoides pentacíclicos a concentraciones 1 μ M (A) y 10 μ M (B) y frente a SAE y EAE a concentraciones de 1 μ g/mL (C) y 10 μ g/mL (D).	93
Figura 50: Efecto inhibitorio de extractos de las hojas de <i>U. molinae</i> y un extracto de referencia de <i>C. asiatica</i> sobre la glicógeno fosforilasa a (GPa)	96

RESUMEN

En esta tesis se observó que los extractos seriados de acetato de etilo (EAE) y etanol (EET) de las hojas de *Ugni molinae* Turcz. (murtilla) son fuente de los ácidos, asiático, alfitólico, corosólico, betulínico, oleanólico, ursólico, madecásico y maslínico, presentes en diferentes concentraciones. Siendo estos dos últimos triterpenoides identificados por primera vez en esta especie. Se obtuvo desde el EET una fracción enriquecida en triterpenoides (SAE), la cual concentró alrededor de 3 veces la cantidad de los ácidos madecásico, asiático, corosólico y maslínico. SAE (1 mg/oreja) demostró tener efecto anti-inflamatorio tópico significativo de un $43,3 \pm 4,2\%$ en el modelo de edema de oreja de ratón inducido por TPA. Este efecto fue atribuible en parte a la presencia del ácido madecásico (DE_{50} 0,11 $\mu\text{mol/oreja}$). SAE (1 y 10 $\mu\text{g/mL}$) y los ácidos madecásico (1 y 10 μM), corosólico (1 μM) y alfitólico (10 μM) redujeron significativamente la cantidad de IL-6 liberada desde adipocitos maduros expuestos a TNF- α .

Tanto EAE como SAE redujeron significativamente el nivel de especies reactivas de oxígeno intracelulares (EROic) inducidas por TNF- α en macrófagos y células β pancreáticas, debiéndose este efecto tanto a los triterpenoides como a los compuestos fenólicos presentes. Los ácidos madecásico, asiático, corosólico, maslínico, alfitólico, ursólico y oleanólico (1 y 10 μM) fueron capaces de disminuir el nivel de EROic inducidas por TNF- α tanto en macrófagos como en células β pancreáticas, siendo el efecto más potente en estas últimas células.

Tanto SAE como EAE (10 $\mu\text{g/mL}$) inhiben el proceso de diferenciación de adipocitos debido en gran parte a sus triterpenoides. Éstos, a una concentración de 10 μM , mostraron un importante efecto inhibitorio.

EET, EAE y SAE (60 $\mu\text{g/mL}$) inhiben la glicógeno fosforilasa α , observándose actividades inhibitorias de $45,9 \pm 4,3$, $92,2 \pm 1,1$ y $91,6 \pm 1,2\%$, respectivamente. Tanto triterpenoides como flavonoides estarían involucrados en este efecto.

ABSTRACT

This study showed that ethyl acetate and ethanol serial extracts (EAE and EET, respectively) from the leaves of *Ugni molinae* Turcz. (murtilla) are source of asiatic, alphitolic, corosolic, betulinic, oleanolic, ursolic, madecassic and maslinic acids at different concentrations. The two latter triterpenoids were identified for the first time in this species. It was obtained from EET a triterpenoid-rich fraction (SAE), which concentrated about 3 times the amount of madecassic, asiatic, corosolic and maslinic acids. SAE (1 mg/ear) showed a significant topical anti-inflammatory effect of $43.3 \pm 4.2\%$ in the TPA-induced mouse ear edema. This effect is due in part to the presence of madecassic acid (ED_{50} 0,11 $\mu\text{mol/ear}$). SAE (1 y 10 $\mu\text{g/mL}$) and madecassic (1 y 10 μM), corosolic (1 μM) and alphitolic (10 μM) acids significantly reduced the amount of IL-6 released from TNF- α -exposed mature adipocytes.

Both EAE and SAE significantly reduced the level of TNF- α -induced intracellular reactive oxygen species (icROS) in macrophages and pancreatic β cells owing this effect to the pentacyclic triterpenes and phenolic compounds occurring in them. Madecassic, asiatic, corosolic, maslinic, alphitolic, ursolic and oleanolic acids (1 and 10 μM) attenuated the TNF- α -induced icROS level, both in macrophages and in pancreatic β cells, being the effect more potent in the latter.

Both SAE and EAE (10 $\mu\text{g/mL}$) inhibited the adipocyte differentiation process in large part due to their triterpenoids. These, at a concentration of 10 μM , showed significant inhibitory effect.

EET, EAE and SAE (60 $\mu\text{g/mL}$) inhibited glycogen phosphorylase a, observing inhibitory activities of 45.9 ± 4.3 , 92.2 ± 1.1 and $91.6 \pm 1.2\%$, respectively. Both triterpenoids and flavonoids were involved in this effect

I. INTRODUCCIÓN

1. Antecedentes de la especie

1.1. Clasificación taxonómica (Montenegro, 2000)

Nombre científico : *Ugni molinae* Turcz.

Sinonimias : *Myrtus ugni* Mol., *Eugenia ugni* Hook. et Arn.

Nombres vulgares : murta, murtila, uñi o ññü (voz mapuche)
Chilean guava (inglés), Chilean cranberry (inglés)

Familia : Myrtaceae

Orden : Myrtales

Clase : Magnoliopsida

División : Magnoliophyta

1.2. Descripción botánica (Huxley y cols., 1999)

Ugni molinae Turcz., es un arbusto perteneciente a la familia Myrtaceae que crece de manera silvestre en las regiones australes de Chile (35° a 42° LS) y que puede alcanzar hasta 2 m de altura. Sus hojas son ovaladas, lanceoladas o elípticas de 1,4 – 3,6 x 0,8 – 2 cm de tamaño, glabras o con algunos pocos pelos dispersos, de agudas a acuminadas con vena media prominente sobre el envés de lámina; sus pecíolos son superficialmente canalizados de 2 – 4 mm; pétalos suborbiculares, carnosos de 5 – 8 mm, rosados; 40 a 60 estambres de 2 – 4 mm. Frutos subglobosos de alrededor de 1 cm de diámetro, rojo oscuros.



Figura 1: *Ugni molinae* Turcz., Myrtaceae

1.4. Antecedentes de uso tradicional y etnofarmacológicos

Ugni molinae es una especie productora de bayas cuyo aroma característico ha sido descrito como una mezcla de notas frutales, dulces y florales debido a sus compuestos volátiles, similares a los encontrados en muchos frutos aromáticos tropicales (Scheuermann y cols., 2008). En las zonas de crecimiento, los frutos de esta especie son altamente apreciados y consumidos como fruto fresco, siendo también procesados como mermelada, conservas en almíbar, empleados en repostería, jugos y licores (Ah-Hen y cols., 2011). Se ha demostrado que estos frutos poseen una rica y diversa composición de compuestos bioactivos con propiedades medicinales, los cuales han sido intensamente estudiados (Schreckinger y cols., 2010). Estos antecedentes han incentivado el desarrollo de estudios que contemplen la domesticación de la especie (Aguila y Nahuelhual, 2008; Franck y cols., 2007) y formulación de patentes que protejan variedades específicas (Seguel y Montenegro, 2010).

La medicina tradicional ha atribuido a las partes aéreas de la especie propiedades astringentes, estimulantes y aromáticas, además de diversas propiedades terapéuticas frente a afecciones de la piel y para el tratamiento de dolores del tracto urinario (Montenegro, 2000; Montes y Wilkomirsky, 1985). La infusión de sus hojas es empleada para suavizar el cutis reseco y aumentar la elasticidad de la piel (Montenegro y cols., 2005). En la actualidad diversos productores cosméticos han desarrollado formulaciones en base a extractos de las hojas de esta especie nativa.

1.5. Estudios previos

1.5.1. Estudios químicos previos

1.5.1.1. Triterpenoides pentacíclicos

Aguirre y cols. (2006) describieron para extractos seriados de las hojas de la especie seis triterpenoides pentacíclicos derivados de los esqueletos ursano, lupano y oleanano (Figura 2). Es así como desde un extracto seriado de diclorometano fueron aislados e identificados los ácidos betulínico, ursólico, oleanólico, afitólico y corosólico y desde un extracto seriado de acetato de etilo fue obtenido el ácido asiático.

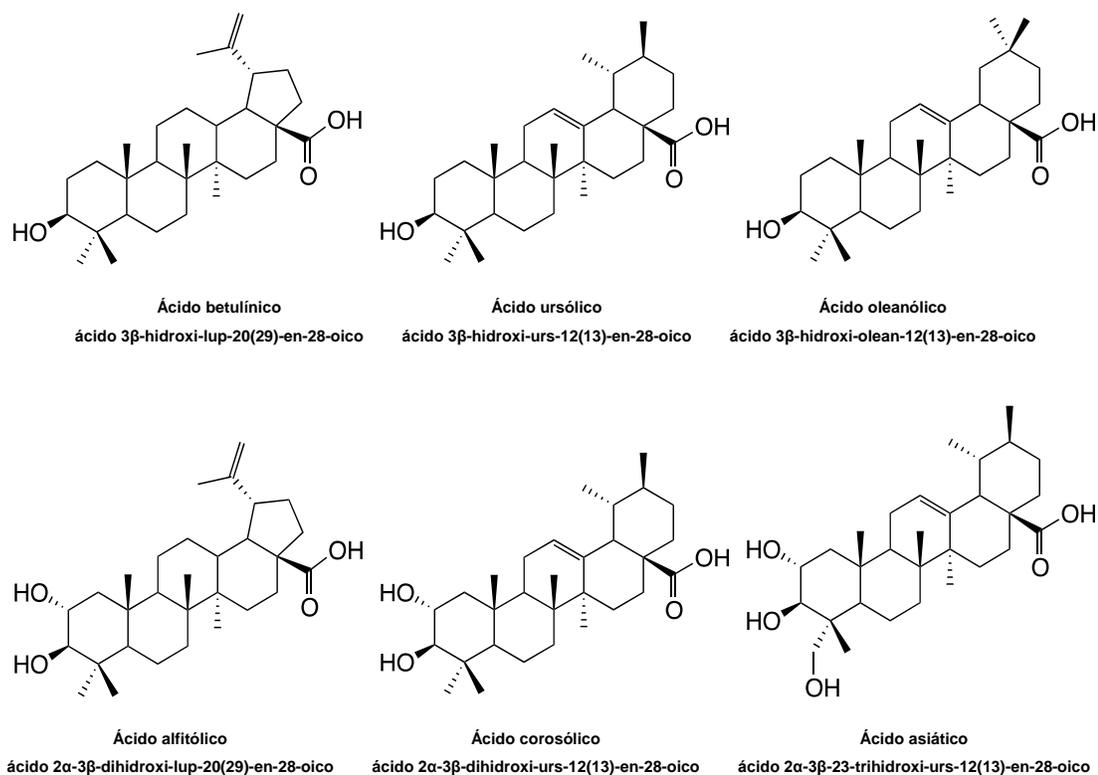


Figura 2: Triterpenoides pentacíclicos previamente identificados en las hojas de *U. molinae* (Aguirre y cols., 2006)

1.5.1.2. Compuestos fenólicos

Rubilar y cols. (2005), mediante cromatografía de líquidos de alta eficiencia acoplada a detector de UV y de espectrometría de masas por ionización por electro-spray en tándem (CLAE-UV-ESI-MSⁿ), identificaron en extractos globales de etanol y metanol de las hojas de *U. molinae* compuestos fenólicos glucosídicos y ramnosídicos derivadas de miricetina, quercetina y canferol, además de epicatequina y miricetina en su estado de aglicona. Del mismo modo, los autores identificaron en un extracto acuoso glucósidos, xilósidos y ramnósidos de miricetina y quercetina además de derivados del ácido gálico.

1.5.2. Estudios farmacológicos previos

1.5.2.1. Actividades anti-inflamatoria y analgésica

Aguirre y cols. (2006) demostraron mediante el ensayo de inflamación tópica en oreja de ratón que los extractos seriados de hexano, diclorometano, acetato de etilo y metanol de las hojas de la especie poseen elevadas actividades anti-inflamatorias debidas principalmente a la presencia de los triterpenoides pentacíclicos descritos.

Las propiedades analgésicas de los extractos seriados de diclorometano, acetato de etilo y metanol de las hojas fueron posteriormente demostradas por Delporte y cols. (2007) mediante los ensayos *in vivo* de contorsiones abdominales, latigazo de la cola y prueba de la formalina en ratones, obteniendo los valores de DE₅₀ indicados en la Tabla 1, validando así el uso tradicional de las hojas en el tratamiento analgésico de diversas dolencias. Los autores vincularon el mecanismo del efecto a la inhibición de la lipooxigenasa y/o ciclooxigenasa en la cascada del ácido araquidónico y/o receptores de opioides. Consideraron también, además de la composición triterpenoidea de los extractos, la presencia de los compuestos fenólicos en los extractos como posibles contribuyentes al efecto total.

Tabla 1: Efectos analgésicos de extractos de hojas de *U. molinae* (Delporte y cols., 2007)

	DE _{50ca-ip} (mg/kg)	±	SEM	DE _{50lc-po} (mg/kg)	±	SEM	DE _{50lc-t} (%)	±	SEM	% E _{pf} (d.u.5%)	±	SEM
DCM	0,21*	±	0,02	199,0*	±	16,0	2,00*	±	1,1	75,5*	±	5,3
EA	0,37*	±	0,03	189,0*	±	10,2	0,35*	±	0,1	77,5*	±	3,9
ME	1,37*	±	0,82	120,0*	±	6,8	1,40*	±	0,2	31,6*	±	12,2
Ibuprofeno	0,85*	±	0,26	45,9*	±	12,0	8,23*	±	0,1	↑76,5*	±	6,3

*p ≤ 0,05. DE_{50ca-ip} = dosis que produce un 50% de analgesia en el ensayo de contorsiones abdominales (administración i.p.); DE_{50lc-po} = dosis que produce un 50% de analgesia en el ensayo del latigazo de la cola (administración p.o.); E_{50lc-t} = dosis que produce un 50% de analgesia en el ensayo del latigazo de la cola (administración tópica); % E_{pf} = Efecto analgésico porcentual en la prueba de la formalina por administración tópica; d.u. = dosis única; DCM = extracto de diclorometano; EA = extracto de acetato de etilo; ME = extracto metanólico; ↑□□ efecto máximo. Cada grupo representa el promedio de ocho animales pretratados con los extractos o el fármaco de referencia ± SEM

1.5.2.2. Actividad antioxidante de extractos de hojas

Recientemente, Rubilar y cols. (2011) demostraron la actividad atrapadora del radical libre DPPH de extractos etanólicos globales de hojas, tallos y frutos de *U. molinae* observando que el extracto de hojas resultó respectivamente 2 y 4 veces más activo que los de tallos y frutas, observando una correlación lineal estadísticamente significativa entre la composición fenólica y la actividad atrapadora del radical libre. En el mismo estudio, se demostró que el mismo extracto de hojas posee la mayor actividad inhibitoria sobre la peroxidación lipídica debida a la presencia de los compuestos fenólicos de elevada polaridad.

1.5.2.3. Otras actividades

Shene y cols. (2012) estudiaron extractos acuosos e hidro-alcohólicos de las hojas secas y observaron un efecto promotor del crecimiento de lactobacilos y bifidobacterias, siendo este último comparable al obtenido con fructo-oligosacáridos, un agente prebiótico de referencia. En el mismo estudio se demostró la sensibilidad de bacterias Gram(-) y -(+) de muestras fecales frente a los mismos extractos.

2. Síndrome metabólico e inflamación

Actualmente no existe una definición clara respecto al síndrome metabólico (SM). Sin embargo se ha establecido como criterio general que el SM es una agrupación de anomalías metabólicas que incluyen obesidad abdominal, resistencia a la insulina, dislipidemia aterogénica, presión sanguínea elevada, perfil pro-trombótico e inflamación (Alberti y Zimmet, 1998; Ross y Despres, 2009), estando asociado a un aumento del riesgo de diabetes del tipo 2, enfermedad cardiovascular y mortalidad (Galassi y cols., 2006; Lorenzo y cols., 2003).

Se ha descrito que la progresión hacia la diabetes tipo 2 en individuos de índice de masa corporal (IMC) entre 25 y 30 kg/m² ocurre con una incidencia tres veces superior que en aquellos de IMC menor que 25 kg/m² y 10 veces superior en individuos obesos (IMC > 30 kg/m²), siendo el sobrepeso y la obesidad predictores tanto de la resistencia a la insulina como de la diabetes (Bonora y cols., 2004).

La acumulación de nutrientes en forma de triglicéridos ocurre principalmente en el tejido adiposo blanco, el cual además de ser un depósito acumulativo de energía es un tejido secretor de sustancias reguladoras de la homeostasis metabólica, tales como las adipocitoquinas leptina, adiponectina, resistina y visfatina, las cuales son factores que conectan el tejido adiposo con la inflamación y el sistema inmunitario (Tilg y Moschen, 2006) y citoquinas pro-inflamatorias entre las cuales destacan el factor de necrosis tumoral α (TNF- α), interleuquina 6 (IL-6) y proteína quimioattractante de monocitos 1 (MCP-1) (Xu y cols., 2003). En su conjunto, estos mediadores constituyen un estado de inflamación crónica sub-clínica que ha sido referida como "metainflamación" (Hotamisligil, 2006). Cabe destacar la abundante vascularización del tejido adiposo blanco, por lo que sus secreciones están comunicadas con otros tejidos del organismo tales como la musculatura esquelética e islotes pancreáticos, ejerciendo al mismo tiempo sobre éstos sus efectos biológicos. Tanto TNF- α como IL-6 promueven la resistencia a la insulina (Hotamisligil y cols., 1993; Senn y cols., 2002), bloqueando (por vía de la proteína quinasa JNK) la actividad del sustrato del receptor de insulina (IRS), el cual es un mediador de la transducción de la señal entre este

receptor y distintos factores de transcripción en el núcleo celular (Hotamisligil y cols., 1996).

Como se mencionó anteriormente, los adipocitos son capaces de secretar MCP-1, para el cual se ha demostrado que contribuye a la infiltración de macrófagos hacia el tejido adiposo, promoviendo la progresión de la resistencia a la insulina y diabetes debido a que esta población de células es responsable en gran parte del TNF- α presente y de cantidades significativas de la óxido nítrico sintasa inducible (iNOS) e IL-6 (Kanda y cols., 2006; Weisberg y cols., 2003). La producción de estas citoquinas por parte de los macrófagos se suma a la de los adipocitos generando un estado inflamatorio progresivo vinculado tanto al aumento de masa del tejido adiposo como al deterioro de la homeostasis metabólica.

3. Síndrome metabólico y estrés oxidativo

Extensas revisiones abordan los mecanismos por los cuales se generan complicaciones debidas a trastornos metabólicos y describen el estrés oxidativo como factor clave (Brownlee, 2001). El exceso de nutrientes disponibles es metabolizado por la mitocondria generando anión superóxido mediante un desacoplamiento abundante y progresivamente disfuncional de la cadena transportadora de electrones conduciendo a daño celular, lo cual al ocurrir en células β favorecerá la progresión de la disfunción metabólica a la diabetes de tipo 2 (Lowell y Shulmanz, 2005). A su vez, las especies reactivas de oxígeno (ERO) generadas en este proceso inducirán la generación de mediadores inflamatorios tales como los mencionados en la sección anterior (Dandona y cols., 2005). De este modo las citoquinas inflamatorias generadas como resultado del daño inducido por ERO se sumarán a las liberadas por la respuesta inmunitaria en el tejido adiposo blanco, potenciando la progresión de la enfermedad. Adicionalmente, Kim y cols. (2010) demostraron el mecanismo por el cual el TNF- α induce la producción de ERO en la mitocondria.

Existe un estrecho vínculo entre los estados hiperglicémicos, el estrés oxidativo y la inflamación crónica. La conjunción de estos acontecimientos fisiológicos debe ser abordada al estudiar agentes capaces de controlar las complicaciones ocasionadas por el deterioro de la homeostasis metabólica.

II. HIPÓTESIS

Las hojas de *Ugni molinae* Turcz. poseen efectos inhibitorios sobre la glicógeno fosforilasa a, actividades moduladoras de la adipogénesis y actividades anti-inflamatorias y antioxidantes. Estos efectos se deben a los metabolitos secundarios presentes en ellas.

III. OBJETIVOS

1. Objetivo general

Contribuir al conocimiento químico y farmacológico de las hojas de *U. molinae*, identificando metabolitos secundarios presentes en las hojas, determinando sus potenciales actividades moduladoras de la actividad de glicógeno fosforilasa a y adipogénesis, así como sus posibles propiedades anti-inflamatorias y antioxidantes.

2. Objetivos específicos

- Determinar para los diferentes extractos y metabolitos secundarios aislados en cantidad suficiente:
 - Su actividad inhibitoria de glicógeno fosforilasa a
 - Su efecto sobre la adipogénesis en preadipocitos
- Aislar e identificar metabolitos secundarios presentes en los extractos bioactivos obtenidos desde las hojas de *U. molinae*.
- Determinar *in vivo* e *in vitro*, mediante distintos modelos, la actividad anti-inflamatoria de las geninas triterpenoides obtenidas en cantidad suficiente.
- Determinar *in vitro* la actividad antioxidante de los diferentes extractos y de las geninas triterpenoides obtenidas en cantidad suficiente empleando diferentes modelos.
- Evaluar relaciones estructura-actividad entre los distintos triterpenoides identificados.

IV. MATERIALES Y MÉTODOS

1. Material vegetal

Fue recolectada en el mes de abril una muestra de hojas de *Ugni molinae* Turcz. (Myrtaceae) de la Provincia de Cauquenes (35° 41' S; 71° 40' O). Se guardó un testigo en el Herbario de la Escuela de Química y Farmacia, Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas de la Universidad de Chile cuyo número de registro corresponde a SQF-22462.

2. Estudios químicos

2.1. Extracción

2.1.1. Obtención de extractos seriados de *U. molinae*

Las hojas fueron secadas en estufa a 40 °C hasta peso constante y molidas para ser sometidas a extracción sucesiva con solventes de polaridad creciente hasta total agotamiento del material vegetal, eliminando completamente el solvente por evaporación a presión reducida en un evaporador rotatorio. Se obtuvieron los extractos secos con hexano (EH), diclorometano (EDCM), acetato de etilo (EAE) y etanol (EET) (Figura 3).

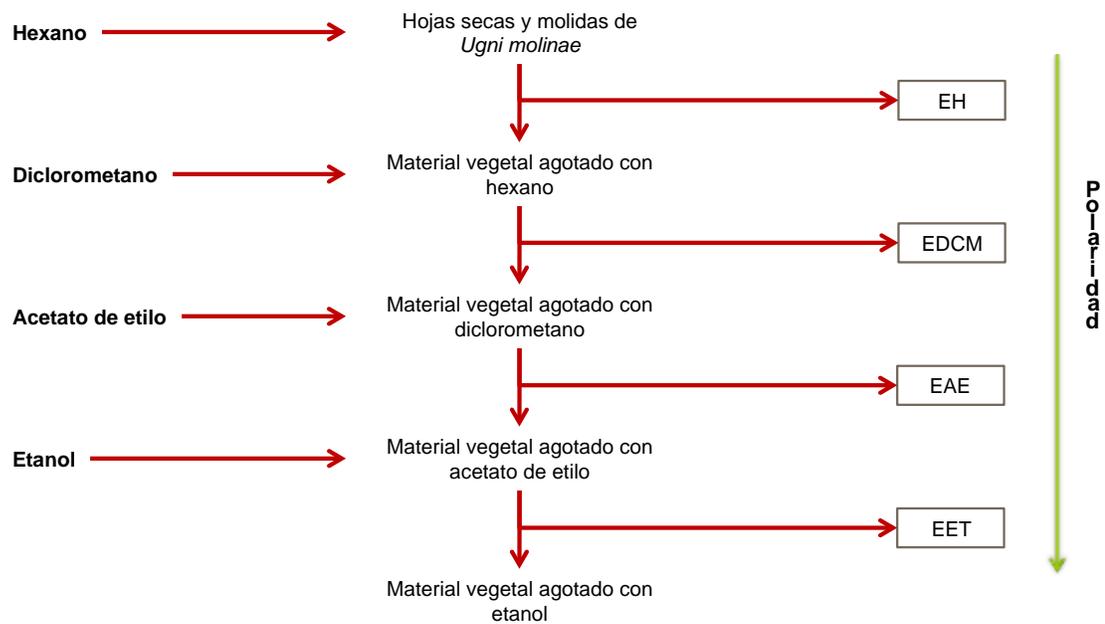


Figura 3: Proceso de extracción seriada de hojas de *U. molinae*

EH: extracto hexánico; EDCM: extracto con diclorometano; EAE: extracto con acetato de etilo; EET: extracto etanólico.

2.1.2. Obtención de una fracción rica en triterpenoides desde el EET

Debido a que el EET es una mezcla compleja que contiene compuestos fenólicos (Rubilar y cols., 2005), sapogeninas (Aguirre y cols., 2006) y saponinas triterpénicas (Avello y cols., 2009) se exploraron dos estrategias, con el fin de seleccionar la metodología más eficiente para obtener fracciones ricas en triterpenoides.

2.1.2.1 Extracción líquido-líquido del EET por reparto entre solventes

Se realizó la extracción empleando EtOAc sobre una suspensión acuosa al 0,8% del EET, obteniendo una fracción denominada FAcet, para posteriormente intentar extraer desde la fase acuosa remanente (FAq1) las saponinas con *n*-butanol (Fbut), como se muestra en la Figura 4.

Tanto FAcet como FBut fueron llevados a sequedad bajo presión reducida mediante un evaporador rotatorio.

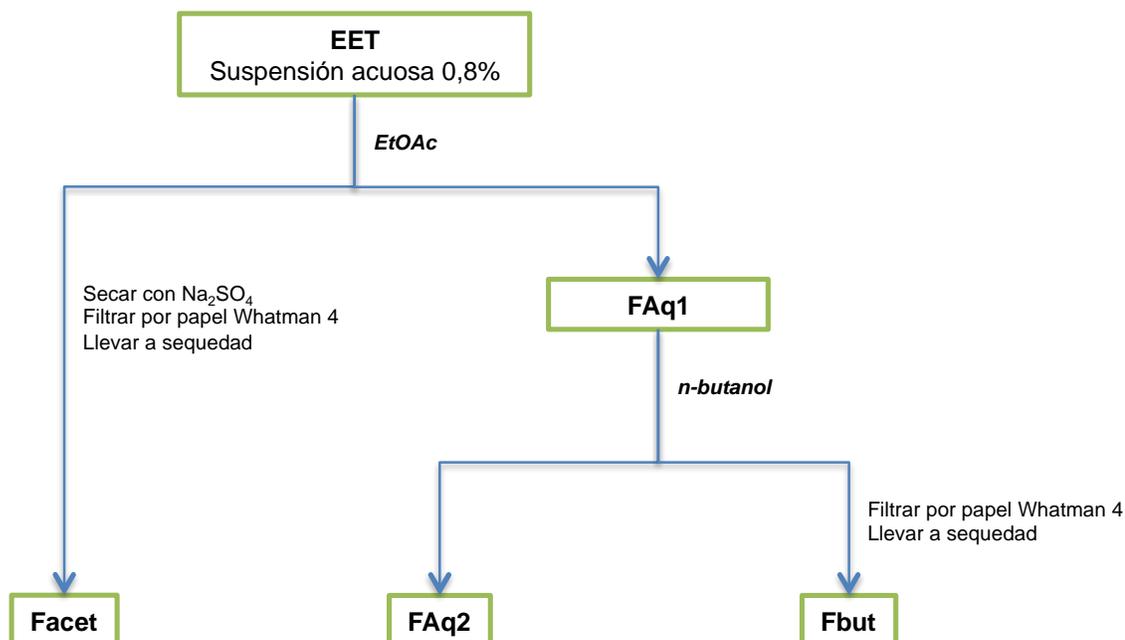


Figura 4: Esquema de extracción líquido-líquido del EET por reparto entre solventes.

FAcet: fracción rica en triterpenoides obtenidos de la fase orgánica de EtOAc; **FAq:** fase acuosa; **Fbut:** fase butánolica

2.1.2.2. Extracción sólido-líquido del EET con aparato de Soxhlet

Se realizó una extracción mediante un aparato de Soxhlet sobre diferentes lotes de 5 g de EET hasta total agotamiento en forma sucesiva con agua, CH_2Cl_2 , EtOAc y EtOH, obteniéndose respectivamente las fracciones AET, SDM, SAE, SET como se muestra en la Figura 5. Se empleó agua como primer solvente con la finalidad de extraer taninos y compuestos hidrosolubles, procediendo con los solventes orgánicos de polaridad creciente y secando completamente a temperatura ambiente por corriente de aire el residuo sólido al finalizar cada extracción exhaustiva. Cada una de las fracciones fue llevada a sequedad a presión reducida mediante un evaporador rotatorio.

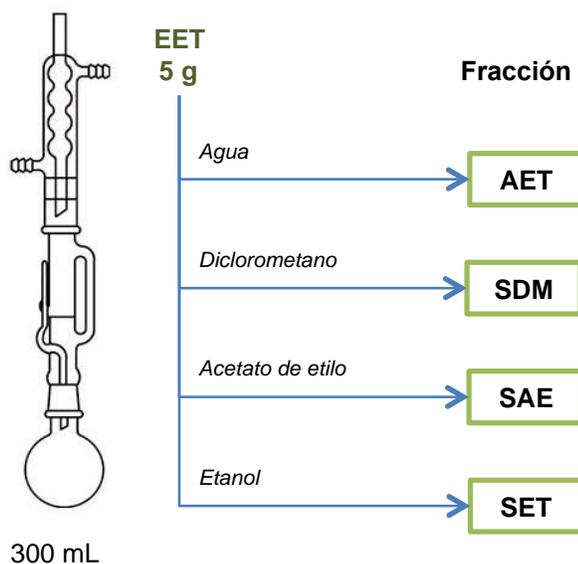


Figura 5: Esquema de extracción sólido-líquido del EET con aparato extractor de Soxhlet

2.2. Aislamiento de metabolitos secundarios desde los extractos bioactivos mediante columna cromatográfica, seguimiento mediante cromatografía en capa fina e identificación por resonancia magnética nuclear

2.2.1. Fraccionamiento por columna cromatográfica abierta (CC)

Para el fraccionamiento y posterior aislamiento por CC fueron empleadas las fases estacionarias gel de sílice 60 (63 – 200 μm y 40 – 63 μm) y Sephadex® LH-20. Se empleó también un sistema de cromatografía de líquidos de mediana presión (MPLC) equipado con una bomba Büchi 688 y fase estacionaria de gel de sílice octadecil silanizada (FR-18) en columna de 45 x 2 cm, Büchi 28147.

2.2.2. Seguimiento mediante cromatografía en capa fina (c.c.f.)

El seguimiento tanto de los procesos de extracción como del fraccionamiento por CC se realizó mediante c.c.f. utilizando cromatofolios de gel de sílice 60 de fase normal y FR-18. Para los cromatofolios en fase normal se empleó como fase móvil las mezclas n-butanol-EtOAc-NH_{3(aq)}-H₂O (6:4:0,5:1) y DCM-EtOAc (8:2) y para FR-18 se empleó una mezcla MeOH-H₂O (8:2). Para revelar triterpenoides se empleó el reactivo de p-anisaldehído-ácido sulfúrico (PAS) y para revelar compuestos fenólicos se empleó el reactivo NP-PEG.

2.2.3. Reactivos reveladores de rociado para c.c.f.

- **p-anisaldehído-ácido sulfúrico (PAS)**

Permite la detección de terpenoides, fenilpropanoides y saponinas al rociar la placa cromatográfica con el reactivo y calentarla posteriormente sobre una plancha a 110 °C.

El reactivo fue preparado disolviendo 0,5 mL de p-anisaldehído en 10 mL de ácido acético glacial, seguido de 85 mL de metanol y 5 mL de ácido sulfúrico concentrado.

- **NP-PEG**

Permite la detección de flavonoides y aloína al rociar la placa con el reactivo, observando la fluorescencia producida bajo luz UV de 365 nm. El comportamiento de fluorescencia es dependiente de la estructura química de los compuestos.

La placa cromatográfica es rociada con una solución metanólica al 1% de difenilboriloxietilamina (NP) seguido de una solución etanólica al 5% de polietilenglicol-4000 (PEG).

2.2.4. Identificación por espectrometría de resonancia magnética nuclear (RMN)

La identificación de los compuestos aislados se realizó mediante espectrometría de ^1H RMN (400 MHz) y ^{13}C RMN (100 MHz) en un equipo Bruker Avance UltraShield 400 (Bruker Daltonik GmbH; Bremen, Alemania) con TMS como estándar interno.

2.3. Caracterización de los extractos de *U. molinae* mediante cromatografía de líquidos de alta eficiencia acoplada a detección por UV y espectrometría de masas por ionización por electro-spray en tándem (CLAE-UV-ESI-MS/MS)

Las muestras se examinaron en un sistema CLAE-UV-ESI-MS/MS que consistió en un sistema CLAE Agilent 1100 (Agilent Technologies Inc.) acoplado al espectrómetro de masas de tipo electro-spray con trampa iónica ESI-IT Esquire 4000 (Bruker Daltonik GmbH, Alemania). Para el control del sistema de CLAE se utilizó el programa ChemStation para CLAE 3D Rev. A.10.02 (Agilent Technologies Inc., CA-USA) y para el control del espectrómetro se utilizó el programa esquireControl 5.2 (Bruker Daltonik GmbH, Alemania).

Para la separación por CLAE se utilizó una columna Hibar Purospher Star RP-18 (250 mm x 4 mm de diámetro interno; tamaño de partícula: 5 μm). A la salida de la columna se conectó un partidador que dividió el flujo hacia el detector de UV y al espectrómetro de masas. La separación de 20 μL de cada muestra se realizó a temperatura ambiente mediante el programa en gradiente señalado en la Tabla 2 a un flujo constante de 0,6 mL/min, detectando a 201 nm.

Tabla 2: Sistema de gradiente para la caracterización por CLAE-UV-ESI-MSⁿ de extractos de *U. molinae*.

Tiempo (min)	Gradiente (%)	
	A	B
0	60	40
40	97	3

A: CH₃CN; B: HCOOH 0,1%

El proceso de ionización (nebulización) mediante electro-spray se realizó a 3000 V asistido por nitrógeno como gas nebulizador a una temperatura de 325 °C, presión de 2 bar y flujo de 10 L/min. Los espectros de masas se adquirieron en polaridad positiva y negativa para el intervalo de barrido de 20 – 1000 m/z , utilizando barrido estándar y resolución normal (velocidad de barrido 13000 $m/z/s$; ancho de pico

0,6 FWHM/ m/z). La trampa de iones se utilizó en el 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 previamente a cada inyección. Adicionalmente, para la selección de los iones precursores se utilizó el modo de exclusión activa (análisis dependiente de datos) con los siguientes parámetros: exclusión, 2 espectros; tiempo de exclusión, 1 min.

El análisis de cromatogramas y espectros de masas se realizó por medio del programa DataAnalysis 3.2 (Bruker Daltonik GmbH, Alemania).

2.4. Estandarización química de extractos de *U. molinae* por cromatografía de líquidos de alta eficiencia

Todos los análisis cuantitativos por CLAE fueron realizados en un equipo de CLAE Waters 600 C acoplado a un detector de arreglo de fotodiodos Waters 996 y equipado con un inyector automatizado Waters 717 plus.

Para la estandarización del EAE y SAE se inyectó en el equipo un volumen de 20 μL de una solución metanólica de 5000 $\mu\text{g/mL}$ y para la estandarización del EET un volumen de 20 μL de una solución metanólica de 10000 $\mu\text{g/mL}$.

Para valorar de manera eficiente la cantidad de triterpenoides en los distintos extractos fue necesario establecer dos condiciones cromatográficas diferentes detalladas a continuación.

2.4.1. Valoración de los ácidos madecásico, asiático, maslínico, corosólico y alfitólico

La valoración de la cantidad de los ácidos madecásico, asiático, maslínico, corosólico y alfitólico en los extractos EAE y EET y la sub-fracción rica en triterpenoides (SAE) se realizó por CLAE con las siguientes condiciones:

Columna : Hibar Purospher Star FR-18 (250 mm x 4 mm de diámetro interno; tamaño de partícula: 5 µm)
Fase móvil : Acetonitrilo – Ácido fórmico 0,1 % (60 : 40)
Flujo : 0,6 mL/min

Se emplearon estándares primarios de los ácidos madecásico (PhytoLab, Alemania), asiático (Sigma) y maslínico (Sigma). La concentración de los ácidos corosólico y alfitólico fue expresada como los ácidos ursólico y betulínico, al no existir patrones primarios comercialmente disponibles.

2.4.2. Valoración de los ácidos betulínico, ursólico y oleanólico

La valoración de la cantidad de los ácidos betulínico, ursólico y oleanólico en los extractos EAE y EET y la fracción rica en triterpenoides (SAE) se realizó por CLAE con las siguientes condiciones:

Columna : Hibar Purospher Star FR-18 (250 mm x 4 mm de diámetro interno; tamaño de partícula: 5 µm)
Fase móvil : Acetonitrilo – Ácido fórmico 0,1 % (75 : 25)
Flujo : 0,7 mL/min

Se emplearon estándares primarios de los ácidos betulínico, ursólico y oleanólico (Sigma).

2.5. Determinación de la cantidad de fenoles totales mediante la reacción de Folin-Ciocalteu

Para la determinación de la cantidad de fenoles totales en los distintos extractos de las hojas de *U. molinae* se empleó el método de Folin-Ciocalteu, el cual se fundamenta en la reacción de oxidación-reducción entre compuestos reductores y el reactivo de Folin-Ciocalteu (RFC) al producirse una transferencia de electrones en medio alcalino, reduciendo el complejo fosfomolibdico/fosfotúngstico a un cromógeno azul el cual es cuantificado por colorimetría (Bray y Thorpe, 2006; Singleton y Rossi, 1965).

Para ello, 50 μL de una solución metanólica al 80% de cada extracto fueron diluidos con 450 μL de agua destilada para luego incorporar a esta solución 2,5 mL de una solución RFC 10 %, y homogeneizar por 5 min a 25 °C. Transcurrido este tiempo, se agregaron 2 mL de Na_2CO_3 5%. Tanto la solución de la muestra como la solución control fueron homogeneizadas e incubadas en baño termostático a 30 °C por 90 min, enfriando por 5 min a temperatura ambiente antes de leer la absorbancia a 765 nm en espectrofotómetro Unicam UV-VIS.

El valor de fenoles totales en las muestras ($n = 3$) fue expresado en $\mu\text{g/mL}$ de ácido gálico para lo cual fue establecida una curva de calibración en un intervalo de 0 a 700 $\mu\text{g/mL}$ (Tawaha y cols., 2007).

Los resultados se presentaron como mg ácido gálico/g de extracto seco \pm SD. La significancia de los resultados fue determinada por el método ANOVA de una vía.

3. Estudios farmacológicos

3.1. Estudios *in vivo*

3.1.1. Animales de experimentación

Fueron empleados ratones de la cepa CF-1 no consanguíneos de 20 – 25 g de peso otorgados por la Unidad de Pruebas Biológicas del Instituto de Salud Pública de Chile (ISP), mantenidos a una temperatura de 18 a 20 °C. Todos los procedimientos fueron realizados bajo los principios éticos que guían la investigación con animales de experimentación, siendo estos aprobados por la Comisión de Ética de la Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas de la Universidad de Chile y del ISP.

3.1.2. Determinación de la actividad anti-inflamatoria tópica

La actividad anti-inflamatoria fue evaluada en grupos de 8 ratones tratados y 16 controles para cada dosis de las muestras en estudio. Luego de 5 minutos del tratamiento con las muestras, los ratones recibieron 5 µg de acetato de 12-O-tetradecanoil-forbol (TPA) (Sigma, St. Louis, MO) disuelto en acetona, como agente pro-inflamatorio (el solvente no interfiere con el ensayo). Los sujetos control sólo recibieron TPA a la misma concentración. Tanto la muestra como el TPA fueron aplicados sobre las superficies interna (10 µL) y externa (10 µL) de la oreja derecha, mientras que la oreja izquierda sólo recibió acetona.

Los ratones fueron sacrificados por dislocación cervical luego de 4,5 h de exposición al TPA y secciones de 6 mm de diámetro de ambas orejas fueron cortadas con un sacabocados y pesadas. La diferencia de peso entre las secciones de ambas orejas correspondió al valor del edema (Lloret y Moreno, 1995). La actividad anti-inflamatoria tópica (AT) fue evaluada de acuerdo a la siguiente ecuación:

$$\%AT = \frac{Pc - Pt}{Pc} \times 100$$

Donde Pc y Pt corresponden respectivamente a las medianas de los pesos de las secciones de las orejas controles y tratadas (Delporte y cols., 2003).

Las dosis de las muestras fueron seleccionadas de acuerdo a trabajos previos en el mismo ensayo biológico (Aguirre y cols., 2006), confirmando la actividad de EAE y EET y estableciendo la de SAE a una dosis de 1 mg. El ácido madecásico fue evaluado a 0,1, 0,2, 0,7, 0,8 y 1,6 $\mu\text{mol/L}$ mientras que el control positivo de indometacina fue ensayado a dosis de 0,2, 0,4, 0,7 y 1,4 $\mu\text{mol/L}$.

3.1.3. Análisis estadístico

La significancia estadística fue evaluada empleando el ensayo de Kruskal-Wallis, seguido del ensayo de comparaciones múltiples de Dunn. El criterio para la significancia estadística fue establecida a un $P \leq 0,05$. Los datos fueron expresados como los valores de mediana \pm SEM calculados del peso del edema para los animales tratados y no tratados, considerando los valores de control como un 100% de inflamación.

3.2. Evaluación de las actividades anti-inflamatoria, antioxidante y anti-adipogénica en modelos celulares

3.2.1. Metodología general

3.2.1.1. Reactivos, materiales e instrumentos de uso general

El TNF- α de ratón, el suero fetal bovino (SFB), tripsina y los medios de cultivo de Eagle modificados de Dulbecco (DMEM) tanto alto o bajo en glucosa como libre de rojo fenol fueron adquiridos de Sigma (St Louis, MO, Estados Unidos). Para todos los casos, se diluyó 100 veces en los medios de cultivo un cóctel de penicilina 10,000 U y estreptomicina 10 mg/mL (Sigma). Para el conteo de células se empleó azul de tripán 0,4% y cámaras desechables de conteo de células en un contador automatizado Countess[®] de Invitrogen Life Technologies (Carlsbad, CA, Estados Unidos). Se empleó material de plástico estéril Falcon de BD Biosciences (Franklin Lakes, NJ, Estados Unidos). Para determinaciones fluorimétricas se emplearon placas negras Costar de Corning Inc. (Corning, NY, Estados Unidos) de 96 pocillos con fondo claro.

Todas las lecturas tanto espectrofotométricas como de fluorescencia fueron realizadas en un lector de microplacas Bio-Tek Synergy HT.

3.2.1.2. Líneas celulares

Para los ensayos se emplearon tres líneas celulares de ratón (*Mus musculus*), todas adquiridas de la ATCC (American Type Culture Collection, Manassas, VA, Estados Unidos): Macrófagos de ascitis (RAW 264.7), células beta de insulinooma pancreático (β -TC-6) y fibroblastos embrionarios (3T3-L1) (Figura 6).

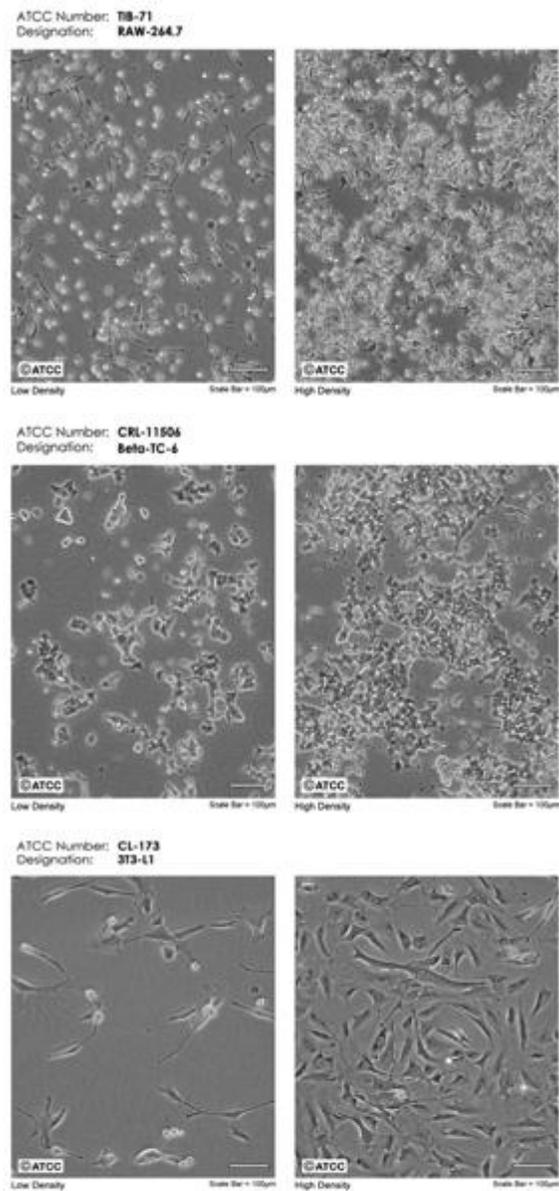


Figura 6: Micrografías de las líneas celulares empleadas (ATCC).

3.2.1.3. Viabilidad celular

El ensayo de viabilidad celular para todos los modelos se realizó mediante el ensayo no radioactivo de proliferación celular CellTiter 96[®] (Promega, Fitchburg, WI, Estados Unidos) el cual es un método colorimétrico que determina el número de células viables en proliferación o en ensayos quimiosensibles. El ensayo se fundamenta en la reacción de bio-reducción celular de la sal de tetrazolio 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-5-(3-carboximetoxifenil)-2-(4-sulfofenil)-2*H*-tetrazolio (MTS) en presencia del reactivo acoplador de electrones sulfometilato de fenacina (PMS) para generar un formazán soluble en el medio de cultivo (Figura 7). La absorbancia del formazán se mide a 490 nm directamente desde una placa de 96 pozos sin procesos adicionales (Bartrop y cols., 1991).

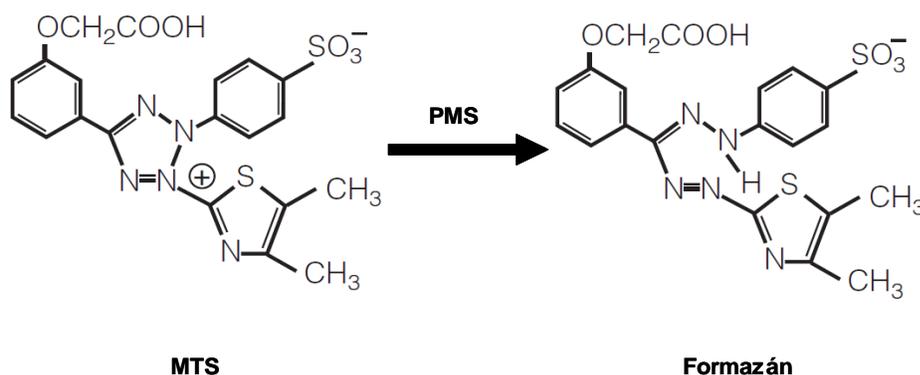


Figura 7: Reacción de reducción de MTS a formazán soluble en medio de cultivo

El procedimiento se realizó siguiendo el protocolo del fabricante, sembrando $7,0 \times 10^3$ células/pocillo. Fueron evaluadas cuatro concentraciones de EAE y SAE (0,1 a 10 $\mu\text{g/mL}$) y cuatro concentraciones de los ácidos madecásico, asiático, corosólico, alfitólico, maslínico, ursólico y oleanólico (0,1 a 100 μM) en macrófagos (RAW 254.6) y pre-adipocitos (fibroblastos 3T3-L1) de ratón. Para células pancreáticas de ratón (β -TC-6) se evaluaron cuatro concentraciones en un intervalo de 0,01 a 10 $\mu\text{g/mL}$ para los extractos y 0,01 a 10 μM para los triterpenoides. Se emplearon como fármacos de

referencia indometacina, ibuprofeno y α -tocoferol, los cuales fueron evaluados a las mismas concentraciones que los compuestos en estudio.

Los resultados fueron expresados como porcentajes de viabilidad celular (% VC) en base al promedio de la medición de cinco réplicas frente a control según la fórmula:

$$\%VC = \frac{Abs_{muestras}^{490\text{ nm}}}{Abs_{controles}^{490\text{ nm}}} \times 100$$

3.2.1.4. Análisis estadístico

La significancia estadística de los datos se obtuvo mediante análisis de varianza y test de comparaciones múltiples de Tukey.

3.2.2. Determinación del nivel de especies reactivas de oxígeno intracelular en macrófagos y células pancreáticas estimuladas con TNF- α

La influencia tanto de los triterpenoides, EAE, SAE y fármacos de referencia (α -tocoferol, indometacina e ibuprofeno) sobre el nivel de especies reactivas de oxígeno intracelulares (EROic) fue evaluada en macrófagos RAW 264.7 y células pancreáticas β -TC-6 previamente estimuladas con TNF- α , induciendo así una respuesta inflamatoria y pro-oxidante.

El nivel de EROic fue evaluado empleando la sonda diacetato de 2',7'-diclorodihidrofluoresceína (DCFH-DA) (Figura 8).

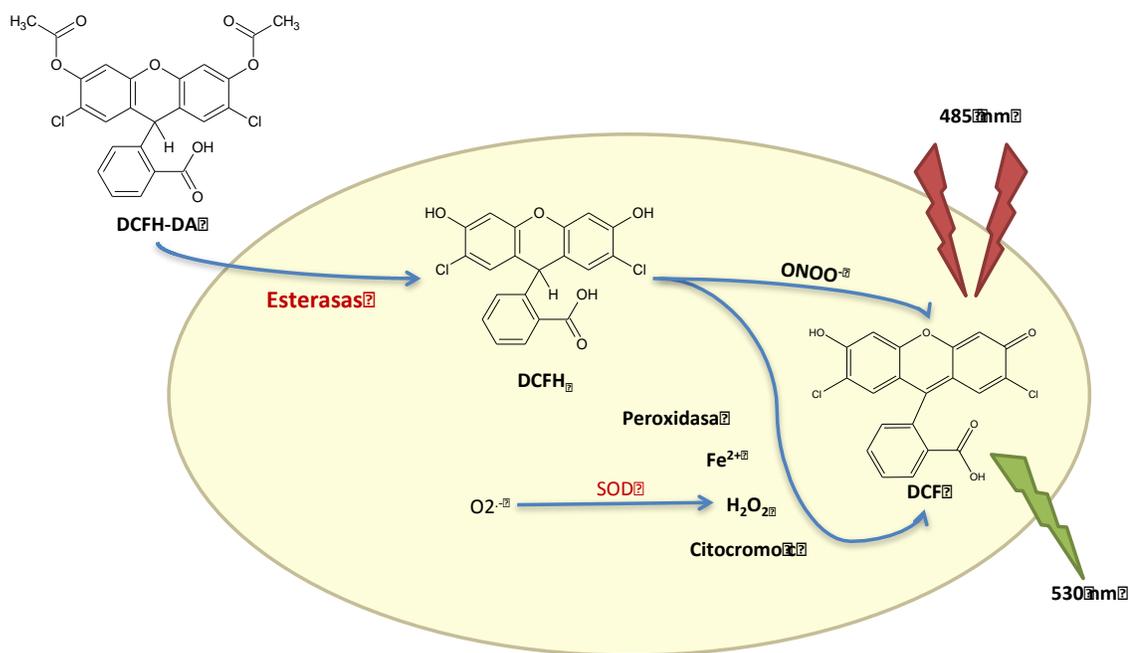


Figura 8: Detección de cantidad de EROic mediante el método de fluorescencia DCFH-DA/DCF.

Para ello, el método descrito por Wang y Joseph (1999) fue modificado sembrando $4,0 \times 10^3$ células/pocillo en placas negras de fondo claro Costar[®] de 96 pocillos con DMEM bajo en glucosa suplementado con SFB 10%. Una vez alcanzada la confluencia celular del 80%, el medio fue reemplazado por medio DMEM libre de rojo fenol sin suplementar con SFB, lavando las células dos veces con el mismo medio con

el fin de eliminar SFB remanente que pudiese contener esterazas. Al medio de cultivo se agregó DCFH-DA 5 μ M, para luego de 30 min inducir las células a un estado inflamatorio mediante estimulación con 2 ng/mL de TNF- α por un período de 90 min. Completada la inducción los macrófagos fueron expuestos a los triterpenoides y fármacos de referencia (10 y 1 μ M) y extractos (10 y 1 μ g/mL) por un período de dos horas midiendo la fluorescencia emitida por DCF a una longitud de onda de excitación de 480 ± 20 nm y de emisión de 530 ± 20 nm tanto al inicio del tratamiento (T_i) como al término (T_f) (Figura 9).

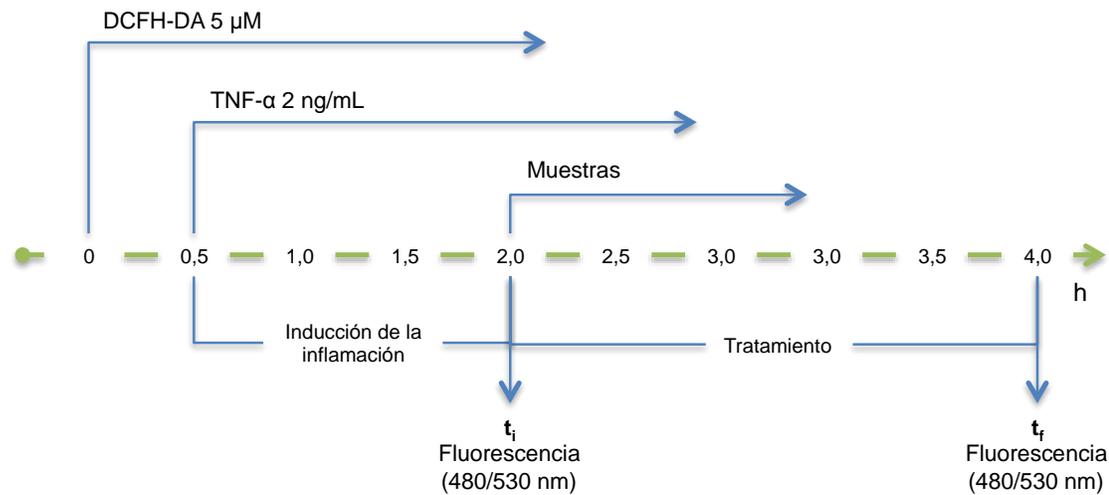


Figura 9: Esquema del tratamiento de la línea celular para la determinación de EROic en macrófagos y células pancreáticas estimuladas con TNF- α .

t_i : tiempo inicial del tratamiento; t_f : tiempo final del tratamiento.

El porcentaje de especies reactivas de oxígeno intracelulares (% EROic) relativo a los controles se calculó mediante la siguiente fórmula:

$$\%EROic = \frac{(Ft_f - Ft_i)_{muestras}}{(Ft_f - Ft_i)_{controles}} \times 100$$

Donde:

Ft_f : Fluorescencia en t_f

Ft_i : Fluorescencia en t_i

3.2.3. Evaluación de la acumulación de triglicéridos en adipocitos

3.2.3.1. Diferenciación celular

Fibroblastos 3T3-L1 (pre-adipocitos) fueron sembrados a una densidad de 6.000 células/pocillo en placas de 6 pocillos. Los pre-adipocitos fueron cultivados en medio DMEM alto en glucosa (DMEM a.g.) suplementado con SFB al 10% e inducidos a diferenciación luego de 2 días de haber sido alcanzado un 100% de confluencia (día 0). Para inducir la diferenciación, el medio de crecimiento fue suplementado con 3-isobutil-1-metilxantina (IBMX) 0,5 mM, dexametasona 1 μ M e insulina 10 μ g/mL por 48 h (día 2). Al día dos, el medio fue reemplazado por DMEM a.g. fresco suplementado con SFB 10%, antibióticos e insulina 10 μ g/mL por dos días adicionales (día 4). Luego del día cuatro, el medio suplementado con insulina fue reemplazado con DMEM a.g. fresco suplementado con SFB 10% y este medio fue reemplazado cada dos días hasta alcanzar completa madurez de las células (día 10).

3.2.3.2. Efecto de las muestras sobre el proceso de diferenciación celular

Los tratamientos tanto con los ácidos madecásico, asiático, corosólico, maslínico, alfitólico, ursólico y oleanólico (10 μ M) como con los extractos SAE y EAE (10 μ g/mL) comenzaron desde el día cero hasta el día diez, diluyendo en el medio de cultivo una cantidad suficiente de las muestras en solución madre de DMSO, cuya concentración final nunca excedió un 0,5% al estar en contacto con las células (concentración que no generó muerte celular en pruebas de viabilidad) (Figura 10).

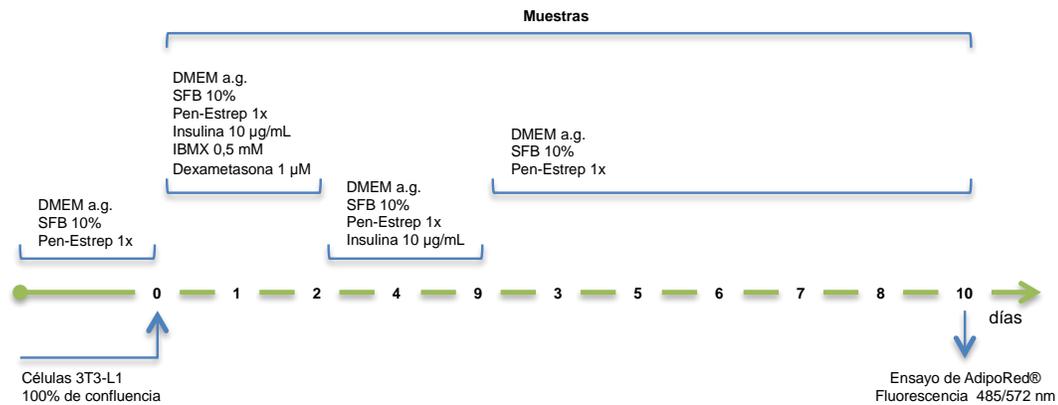


Figura 10: Esquema del tratamiento de la línea celular para la determinación de la acumulación de triglicéridos en células 3T3-L1 en presencia de las muestras a partir del inicio de la diferenciación de las células.

Pen-Estrep: cóctel de antibióticos penicilina y estreptomina

La acumulación de triglicéridos en las células fue determinada mediante el ensayo de AdipoRed® (Lonza, Suiza) que consiste en la tinción de lípidos intracelulares mediante una solución hidrofílica de Rojo Nilo el cual al ser particionado a un ambiente lipofílico se torna fluorescente. La intensidad de la fluorescencia con una excitación a 485 nm y una emisión a 535 nm ($F^{485/535}$) es proporcional a la cantidad de lípido acumulado. La cantidad de triglicéridos acumulados en adipocitos tratados con las muestras (n = 4) frente al grupo control de células no tratadas (n = 8) fue calculada según la siguiente fórmula:

$$\% \text{ Acumulación de triglicéridos} = \frac{F_{\text{tratadas}}^{485/535}}{F_{\text{controles}}^{485/535}} \times 100$$

Los resultados fueron expresados como % Acumulación de triglicéridos ± SEM.

3.2.3.3. Efecto de las muestras sobre la acumulación de triglicéridos en adipocitos estimulados con TNF- α

Para evaluar el efecto de las muestras sobre la acumulación de triglicéridos en adipocitos en estado inflamado fue necesario diferenciar células 3T3-L1 de acuerdo a la metodología señalada en el punto 3.2.3.1. Al décimo día, las células ya diferenciadas fueron expuestas a las muestras junto a TNF- α (2 ng/mL) para determinar el nivel de acumulación de triglicéridos a las 24 horas de exposición (Figura 11). Se consideró como control negativo el grupo de células no expuestas y como control positivo el grupo de células expuestas a TNF- α (2 ng/mL) sin agregado de muestras.

La acumulación de triglicéridos en las células tratadas fue determinada frente al control negativo mediante el ensayo de AdipoRed® descrito en el punto 3.2.3.2.

Los resultados fueron expresados como % Acumulación de triglicéridos \pm SEM.

3.2.4. Evaluación del efecto de las muestras sobre la liberación de IL-6 desde adipocitos estimulados con TNF- α

Para evaluar el efecto de las muestras sobre la liberación de IL-6 desde adipocitos en estado inflamado fue necesario diferenciar células 3T3-L1 de acuerdo a la metodología señalada en el punto 3.2.3.1. Al décimo día, las células ya diferenciadas fueron expuestas tanto a las muestras como a TNF- α (2 ng/mL) (Figura 11) para determinar el nivel de liberación de IL-6 al medio de cultivo mediante un ensayo de inmunoabsorción ligado a enzimas (ELISA) (Qiagen, Estados Unidos) en donde un anticuerpo específico para la citoquina recubre la superficie útil de una placa de 96 pocillos la cual une y captura la interleuquina de interés presente en las muestras. Luego de lavar la placa se agregó un anticuerpo de detección asociado a biotina, el cual se unió a la IL-6 capturada. Un segundo lavado fue requerido para eliminar material no unido, para luego agregar un conjugado de avidina-peroxidasa de rábano. Los pocillos fueron nuevamente lavados y se agregó una solución de sustrato colorimétrico, el cual produjo un color azul en proporción a la cantidad de analito

presente. El desarrollo de color fue detenido mediante un reactivo de detención y se leyó la absorbancia a 450 nm. Las lecturas de las muestras fueron luego comparadas con la curva de calibración utilizando IL-6 patrón, obteniendo la concentración promedio de esta citoquina ($\text{pg/mL} \pm \text{SEM}$) como resultado de 5 réplicas. El grupo control negativo consistió en células no estimuladas con $\text{TNF-}\alpha$ ni tratadas con las muestras, mientras que el grupo control positivo correspondió a las células estimuladas con $\text{TNF-}\alpha$ no tratadas con las muestras, considerado la concentración de IL-6 liberada al medio como el 100 %.

Se ha demostrado que la suplementación con α -tocoferol ($50 \mu\text{M}$) en dietas altas en grasa disminuye la producción de IL-6 en tejido adiposo blanco de ratones y en células 3T3-L1 estimuladas con lipopolisacárido (LPS) (Lira y cols., 2011). Por esta razón, se incluyó esta vitamina en el ensayo como referencia en cantidades equimolares a las de los triterpenoides evaluados.

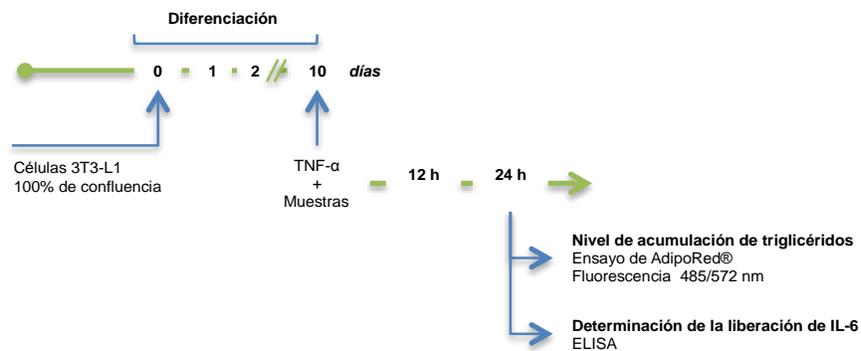


Figura 11: Esquema del tratamiento de la línea celular para la determinación de la acumulación de triglicéridos y liberación de IL-6 en células 3T3-L1 estimuladas con $\text{TNF-}\alpha$ (2 ng/mL).

3.3. Evaluación del efecto de las muestras sobre la actividad de catalasa y xantina oxidasa

3.3.1. Extracción enzimática

Para realizar el ensayo de la catalasa fue necesario aislar la enzima de células 3T3-L1. Para ello, las células fueron llevadas a confluencia en una placa de 100 mm de diámetro y luego el medio de cultivo fue reemplazado por un tampón de lisis constituido por HEPES 20 mM (pH 7,2) con EGTA 1 mM, manitol 210 mM y sacarosa 70 mM, para ser removidas mediante un raspador de goma. Las células fueron centrifugadas a 1000 x g por 10 min a 4 °C y luego sometidas a lisis mediada por ultrasonido por 5 min. El lisado de células fue centrifugado a 1500 x g por 5 minutos a 4 °C y el sobrenadante recolectado para realizar los ensayos.

3.3.2. Determinación de la actividad enzimática

La determinación de la actividad enzimática se realizó por espectrofotometría empleando un “kit” de valoración de enzimas en muestras biológicas (Cayman Chemical, Ann Arbor, MI, Estados Unidos), como se detalla a continuación.

3.3.2.1. Actividad de xantina oxidasa

La actividad de la enzima frente a las muestras fue determinada colorimétricamente al detectar la cantidad de anión superóxido generado por la xantina oxidasa, empleando una sal de tetrazolio como cromógeno que reacciona con el anión superóxido para producir formazán (Figura 12). Este compuesto presenta un máximo de absorbancia a 460 nm y el valor es directamente proporcional a la actividad de la enzima.

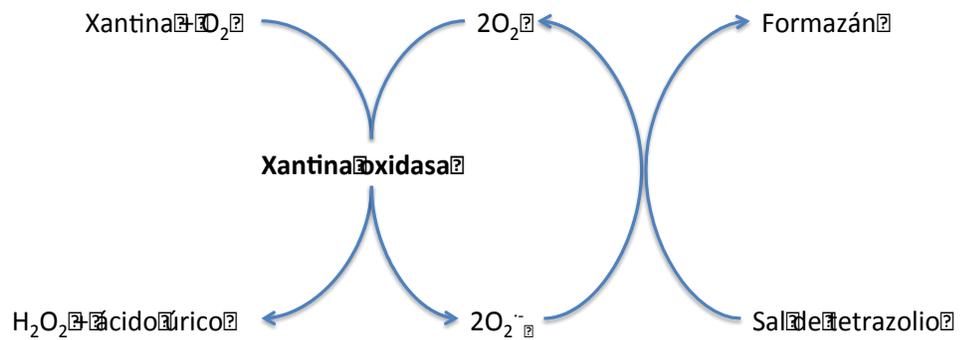


Figura 12: Esquema del ensayo de determinación de la actividad de la XO

Se determinó el porcentaje de actividad enzimática en presencia de las muestras frente al grupo control no expuesto ($n = 5$) mediante la siguiente fórmula:

$$\% \text{ Actividad de XO} = \frac{Abs_{muestra}^{460 \text{ nm}}}{Abs_{control}^{460 \text{ nm}}} \times 100$$

donde el grupo control corresponde a la enzima no expuesta a las muestras.

3.3.2.2. Actividad de la catalasa

Se evaluó un posible efecto de las muestras sobre la actividad de la catalasa. Para ello se empleó un “kit” para la determinación de la actividad enzimática en muestras biológicas (Cayman Chemical, Ann Arbor, MI, Estados Unidos) adaptando las instrucciones entregadas por el fabricante, incluyendo en el medio de reacción las muestras junto con la enzima previamente aislada desde los macrófagos RAW 264.7 cómo se detalla en 3.2.1.

El ensayo utiliza la función peroxidativa de la enzima. El método se basa en la reacción de la enzima con metanol en presencia de una concentración óptima de H₂O₂. El formadehído producido se mide colorimétricamente con 4-amino-3-hidracino-5-mercapto-1,2,4-triazol (Purpald) como cromógeno. Purpald forma un heterociclo bicíclico con aldehídos, el cual luego de la oxidación cambia de incoloro a púrpura y su absorbancia es medida a 540 nm, cuya intensidad es directamente proporcional a la actividad de la enzima.

Se determinó el porcentaje de actividad enzimática en presencia de las muestras frente al grupo control no expuesto (n = 5) mediante la siguiente fórmula:

$$\% \text{ Actividad de catalasa} = \frac{Abs_{muestra}^{540 \text{ nm}}}{Abs_{control}^{540 \text{ nm}}} \times 100$$

donde el grupo control corresponde a la enzima no expuesta a las muestras.

3.4. Evaluación del efecto de los extractos de *U. molinae* sobre la actividad de la glicógeno fosforilasa a

La actividad de la glicógeno fosforilasa a (GPa) de músculo de conejo en presencia de EAE, SAE y EET fue determinada por espectrofotometría. La actividad de GPa fue medida en dirección de la síntesis de glicógeno por liberación de ión fosfato desde glucosa-1-fosfato. Cada extracto fue disuelto en DMSO a una concentración de 60 µg/mL. La enzima fue agregada a un volumen total de 250 µL de tampón HEPES 50 µM (pH 7,2) que contenía KCl 100 mM, MgCl₂ 0,5 mM, glucosa-1-fosfato 0,5 mM, glicógeno 1 mg/mL y la solución de las muestras. Luego de 20 minutos de reacción enzimática a 22 °C, fueron agregados 750 µL de una solución de molibdato de amonio (10 mg/mL) y verde de malaquita (0,38 mg/mL) en HCl 1 M, midiendo la absorbancia a 620 nm luego de 5 min de la adición de esta solución (Wen y cols., 2008).

Se empleó como referencia una fracción de *Centella asiatica* comercial cuya composición declarada corresponde a un 40% de asiaticósido, 30% de ácido madecásico y 30% de ácido asiático.

V. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

1. Estudios químicos

1.1. Extracción

1.1.1. Obtención de extractos seriados y sus rendimientos

El rendimiento de la obtención de los extractos se detalla en la Tabla 3.

Tabla 3: Rendimiento del proceso de extracción de las hojas de *Ugni molinae*

Rendimiento (% p/p)	
EH	1,4
EDCM	5,9
EAE	3,7
EET	22,2

1.1.2. Obtención de una fracción rica en triterpenoides desde el EET

A continuación se describen los resultados de las dos técnicas utilizadas para obtener una fracción purificada y enriquecida en los triterpenoides presentes en el EET.

1.1.2.1. Extracción líquido-líquido del EET por reparto entre solventes

Se emprendió en primera instancia una extracción por reparto entre solventes que permitiera aislar todos los compuestos de posible naturaleza triterpénica, cuya presencia pudimos observar al analizar por c.c.f. el EET con distintos patrones de triterpenoides, en distintos sistemas de disolventes y distintas fases estacionarias. Es así como confirmamos la presencia de los ácidos corosólico y asiático y un compuesto denominado U7 el cual resultó coincidir en R_f con el ácido madecásico presente en un extracto estandarizado de *C. asiatica* (Figura 13). De este modo, se realizó una extracción empleando EtOAc sobre una suspensión acuosa al 0,8% de EET para posteriormente intentar extraer las saponinas desde la fase acuosa (FAq1) con n-butanol (Fbut) (Figura 4). Desde la fase orgánica de EtOAc (FACet) se obtuvo una fracción cruda de triterpenoides que mantuvo la composición terpénica del EET (Figura 13).

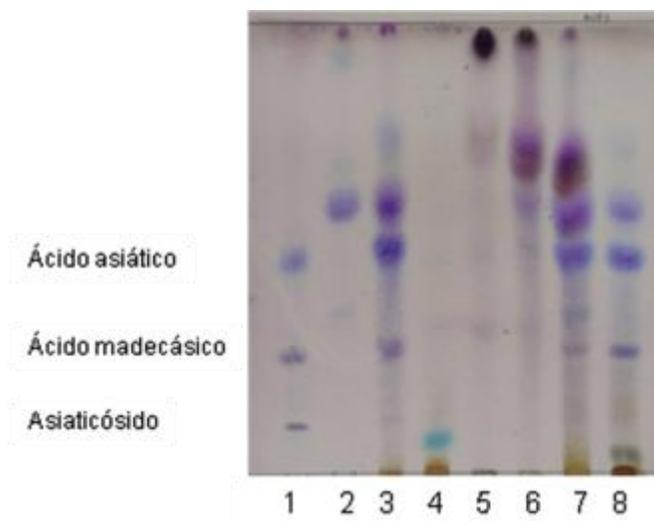


Figura 13: Cromatografía en capa fina de FACet y FBut, productos de la extracción del EET por reparto entre solventes y comparación con los distintos extractos

1: Extracto de *C. asiatica*; 2: ácido corosólico; 3: FACet; 4: FBut; 5: EH; 6: EDCM; 7: EAE; 8: EET. Fase móvil: n-but:AcOEt:NH₃:H₂O = 6:4:0,5:1, reactivo revelador: PAS

Es importante señalar que este procedimiento presentó dificultades. Observamos que el EET no es totalmente soluble en agua y genera emulsiones de difícil manejo, impidiendo obtener óptimos rendimientos. Por lo tanto, decidimos explorar una extracción sólido-líquido con un aparato de Soxhlet.

1.1.2.2. Extracción sólido-líquido del EET con aparato de Soxhlet

Se realizó una extracción con aparato de Soxhlet de diferentes lotes de 5 g de EET en forma sucesiva hasta total agotamiento con H₂O, CH₂Cl₂, EtOAc y EtOH, obteniéndose respectivamente las fracciones AET (70%), SDM (2%), SAE (10%) y SET (12%) (Figura 14). Esta metodología resultó ser eficiente, superando también las dificultades operacionales observadas en la extracción líquido-líquido de la sección 1.1.2.1.

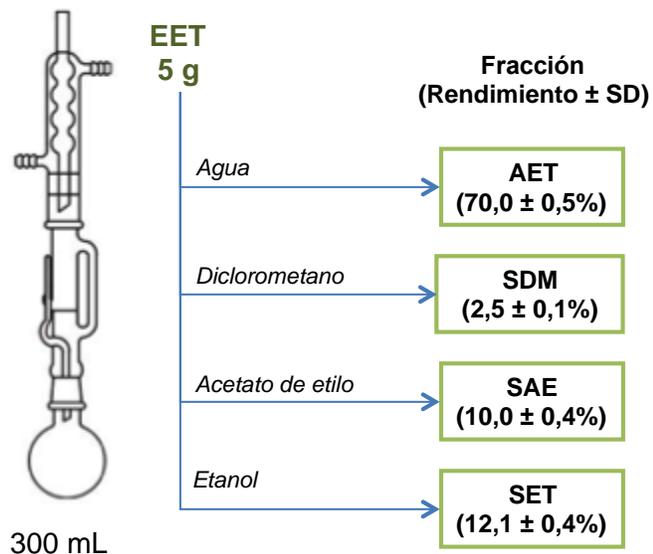


Figura 14: Esquema de extracción del EET mediante un aparato de Soxhlet y los rendimientos del proceso

Se confirmó en SAE la presencia de los ácidos asiático y corosólico, además de la mezcla de los ácidos ursólico y oleanólico y el compuesto U7. Es importante señalar que la extracción inicial con agua del EET y una posterior extracción con CH_2Cl_2 permitieron que SAE sea una fracción rica en triterpenoides pentacíclicos con baja cantidad de polifenoles como se detallará en 1.3.7 y 1.5, respectivamente. El fraccionamiento en CC para el aislamiento de U7 desde SAE se detalla en la sección 1.2.1.

La Figura 15 muestra una c.c.f. que da cuenta de la presencia de los distintos triterpenoides previamente identificados para esta especie, cuya identidad fue confirmada por CLAE-DAD: ácidos asiático (7), corosólico (8), alfitólico (9), ursólico (10), oleanólico (11) y betulínico (14). Se puede observar que todos los compuestos mencionados se encuentran presentes tanto en el EAE (3) como en el EET (4) y que tanto el EH como el EDCM poseen aparentemente menor abundancia de terpenoides de polaridades superiores a las de los ácidos ursólico y oleanólico. Cabe destacar que el SAE (5 en Figura 15) conservó los triterpenoides presentes en EET, disminuyendo la cantidad de compuestos polares retenidos en el origen de la siembra sobre el cromatofolio.

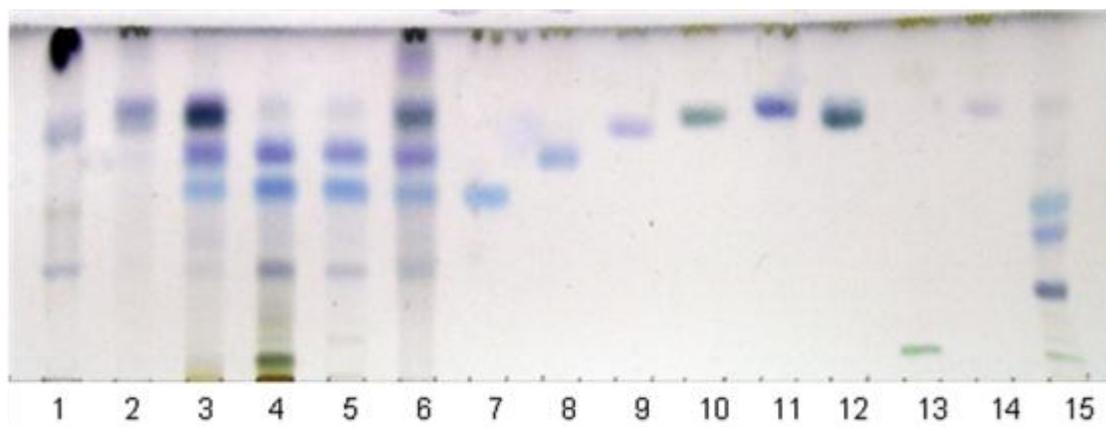


Figura 15: c.c.f comparativa de los distintos extractos de *U. molinae* y patrones

1: EH; 2: EDCM; 3: EAE; 4: EET; 5: SAE; 6: SDM; 7: ácido asiático; 8: ácido corosólico; 9: ácido alfitólico; 10: ácido ursólico; 11: ácido oleanólico; 12: mezcla de ácidos oleanólico y ursólico; 13: asiaticósido; 14: ácido betulínico; 15: extracto de *C. asiatica*. Fase móvil: n-But:AcOEt:NH₃:H₂O = 6:4:0,5:1, revelador: PAS

1.2. Fraccionamiento en columna cromatográfica abierta (CC)

1.2.1. Fraccionamiento en CC de SAE

2,5 g de SAE fueron fraccionados a través de una CC de gel de sílice 60 (63 – 200 μm de tamaño de partícula) empleando como eluyentes mezclas de CH_2Cl_2 -EtOAc y EtOAc-MeOH de polaridad creciente. Se recogieron fracciones de 1000 mL. La fracción CH_2Cl_2 -EtOAc (30:70) (22%) resultó estar compuesta de ácido asiático y el compuesto U7. El compuesto U7 no había sido identificado anteriormente en esta especie, por lo que fue aislado por medio de repetidas cromatografías preparativas en capa fina (placas de soporte de vidrio con capas de 1 mm de espesor de gel de sílice 60 G), cada una con 6 mg de fracción a separar. Éstas fueron eluidas con MeOH (detectando los triterpenoides en una franja lateral de 2 cm con PAS) y se empleó EtOH p.a. para extraer el compuesto aislado del gel de sílice raspado. La solución filtrada fue evaporada, obteniéndose 10 mg (17% de rendimiento) de un precipitado blanco el cual fue identificado como ácido madecásico (Figura 16) por espectroscopía de RMN (Anexos 1 y Tabla 4), comparando con los espectros de RMN de ácido madecásico patrón en metanol- d_4 y análisis bibliográfico (Du y cols., 2004). La presencia de este triterpenoide en los extractos fue confirmada por ESI-MS/MS como será detallado en la sección 1.3.7.

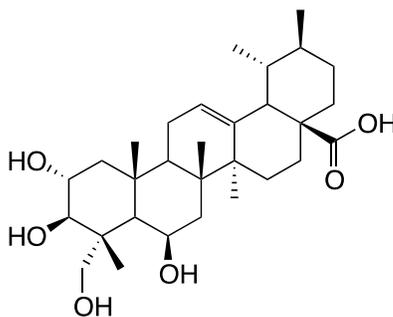


Figura 16: Ácido madecásico

Tabla 4: Desplazamientos químicos de RMN-¹³C de U7, ácido madecásico patrón, datos de bibliografía para ácido madecásico y una estimación *in silico* para ácido madecásico.

C	Tipo	δ (ppm)			
		U7 metanol- <i>d</i> 4	Ácido madecásico patrón metanol- <i>d</i> 4	Ácido madecásico (Du y cols., 2004) C ₅ D ₅ N	Estimación <i>in silico</i> *
1	CH ₂	45,8	45,8	48,2	48,2
2	CH	68,2	68,2	68,9	69,0
3	CH	76,9	76,7	78,7	78,5
4	C	41,4	41,4	43,1	43,1
5	CH	46,2	46,2	48,7	48,6
6	CH	67,0	67,0	67,6	67,6
7	CH ₂	39,9	39,9	39,3	39,0
8	C	38,4	38,4	39,5	39,5
9	CH	†	†	48,9	48,9
10	C	37,1	37,1	37,9	38,0
11	CH ₂	23,0	23,0	25,0	25,0
12	CH	125,6	125,6	126,0	126,0
13	C	137,7	137,6	138,6	138,6
14	C	42,4	42,4	44,2	44,3
15	CH ₂	27,3	27,3	28,7	28,7
16	CH ₂	23,9	23,9	26,0	26,0
17	C	43,3	43,3	48,0	48,0
18	CH	53,0	53,0	53,3	53,3
19	CH	37,2	37,1	38,0	38,1
20	CH	†	†	39,0	39,1
21	CH ₂	27,7	27,7	31,0	31,0
22	CH ₂	30,3	30,3	37,5	37,5
23	CH ₂	64,7	64,4	66,5	66,6
24	CH ₃	13,8	13,8	15,5	15,5
25	CH ₃	16,2	16,2	17,4	17,2
26	CH ₃	17,6	17,6	18,7	18,6
27	CH ₃	22,7	22,7	23,7	23,8
28	C	180,2	180,4	179,2	179,8
29	CH ₃	20,1	20,1	17,7	21,3
30	CH ₃	17,4	17,4	21,1	18,3

*ACD/Labs SpecManager; †Desplazamiento bajo señal debida a solvente

1.2.2. Fraccionamiento en CC de EAE

Con el fin de aislar el ácido alfitólico para las evaluaciones farmacológicas, EAE (5 g) fue fraccionado mediante CC por gel de sílice 60 (63 – 200 μm de tamaño de partícula) y las diferentes fracciones fueron eluidas con mezclas de disolventes de polaridad creciente (hexano-EtOAc y finalmente MeOH 100%) (Tabla 5). Las fracciones obtenidas fueron concentradas al vacío y analizadas por c.c.f. con distintas fases móviles y estacionarias, con triterpenoides patrones y reveladas con PAS. De esta forma se pudo comprobar la presencia de los ácidos ursólico, oleanólico, alfitólico, corosólico y asiático.

Tabla 5: Fraccionamiento de EAE para la obtención de fracciones crudas de triterpenoides pentacíclicos

Fracción	Fase móvil	Volumen total de elución	Rendimiento (%)	Composición
AE1	HEX : AcOEt = 80:20	3 L	10	clorofila ácido ursólico ácido oleanólico
AE2	HEX : AcOEt = 75:25	4,5 L	5	clorofila ácido ursólico ácido oleanólico ácido alfitólico
AE3	HEX : AcOEt = 70:30	1 L	30	ácido ursólico ácido oleanólico ácido alfitólico ácido corosólico
AE4	HEX : AcOEt = 60:40	7 L	28	ácido ursólico ácido oleanólico ácido alfitólico ácido corosólico
AE5	HEX : AcOEt = 50:50	1 L	2	ácido corosólico ácido asiático
AE6	MeOH	2,5 L	25	ácido asiático Polifenoles

Las fracciones AE3 y AE4 se reunieron en una y fueron sometidas a fraccionamiento por CC de gel de sílice 60 (40-63 μm de tamaño de partícula), eluyendo con mezclas de CH_2Cl_2 -EtOAc de polaridad creciente, obteniendo una fracción CH_2Cl_2 -EtOAc (50:50) que contiene en proporción 50:50 (determinado por CLAE-UV-ESI-MS/MS, sección 1.3.5) una mezcla de los ácidos alfitólico y corosólico, los cuales fueron separados posteriormente mediante repetidos fraccionamientos de porciones de 100 mg por cromatografía de líquidos de media presión empleando una columna de gel de sílice RP-18 y eluyendo con un flujo de 5 mL/min de MeOH- H_2O (90:10) y recogiendo fracciones de 15 mL.

1.3. Caracterización de los extractos de *U. molinae* mediante cromatografía de líquidos de alta eficiencia acoplada a detección por UV y espectrometría de masas con ionización por electro-spray en tándem (CLAE-UV-ESI-MS/MS)

Para caracterizar los EAE, EET y SAE fueron inyectados como patrones primarios los ácidos asiático, oleanólico y la mezcla de los ácidos ursólico y oleanólico y como patrón secundario el ácido alfitólico. Las moléculas deprotonadas $[M-H]^-$ y sus fragmentos mayoritarios fueron observados en el escaneo completo de los espectros MS^1 y MS^2 en modo de ión negativo. Se obtuvo así el patrón de fragmentación de dichos estándares y se confirmó su presencia en los extractos de *U. molinae* al ser sometidos a las condiciones cromatográficas detalladas en la sección 2.3 de materiales y métodos.

Bajo las condiciones de análisis se observó en los espectros de fragmentación que todos los patrones estudiados como también los triterpenoides presentes en los extractos generarían en el MS^2 un fragmento análogo al descrito por Chen y cols. (2011), quienes observaron para los ácidos ursólico y oleanólico una pérdida de HCHO y H_2O que resultó en un fragmento de 407 m/z . Estos resultados se replicaron para los ácidos ursólico y oleanólico analizados en esta tesis (Figura 20). Se observó además que las pérdidas de masa en las fragmentaciones MS^2 de los triterpenoides corresponden principalmente a grupos -OH y $-CH_2OH$ ó $-CH_3$. No se observaron indicios de fragmentaciones retro-Diels-Alder, debido posiblemente a que las condiciones de fragmentación son considerablemente menos energéticas que las implicadas en espectrometría de masas por impacto electrónico a 70 eV, en donde los fragmentos producto de dicha reacción son característicos para el tipo de compuestos aquí estudiado.

1.3.1. Análisis por CLAE-UV-ESI-MS/MS del ácido asiático

En el cromatograma de CLAE se obtuvo un tiempo de retención de 7,8 min para el ácido asiático patrón (p.m. 488,7) desde el cual se obtuvo su espectro de masas MS1 por ESI en modo de ión negativo (Anexo 2.1.). Junto con el ión molecular $[M-H]^-$ de m/z 487 se observaron dos iones con m/z 523 y 976, correspondiendo ambos respectivamente a los aductos $[M+Cl]^-$ y $[2M-H]^-$. Estos aductos en MS² generaron como fragmento único el ión molecular observado en MS1. En el espectro MS² del ión $[M-H]^-$ del ácido asiático se pueden observar sus principales fragmentos, detallados en la Tabla 6.

Se propone en la Figura 17 una ruta que explicaría la generación de los principales fragmentos del espectro MS² del ión $[M-H]^-$. Se observa una pérdida de H₂O que correspondería a los carbonos C-2 y C-3 y la pérdida de HCHO (eventualmente en etapas sucesivas de descarbonilación y deshidrogenación) para obtener un fragmento de m/z 439, el cual es coherente con los estudios de Chen y cols. (2011) para triterpenoides pentacíclicos ácidos.

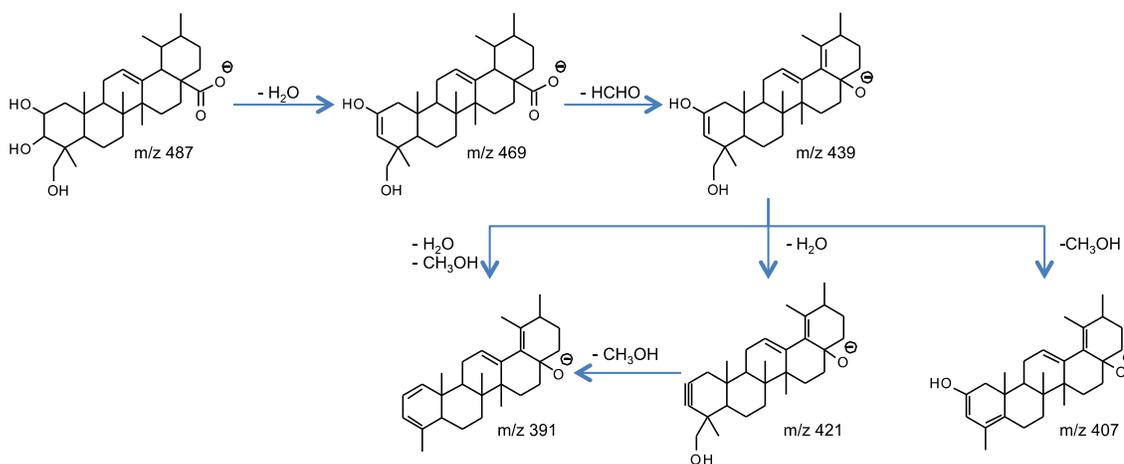


Figura 17: Ruta de fragmentación ESI-MS propuesta para el $[M-H]^-$ del ácido asiático

Se propuso también la pérdida ulterior del grupo $-CH_2-OH$, originando el fragmento de m/z 407. También se observó una pérdida de otro hidroxilo en C-3 ó C-2

de manera conjunta o independiente con $-\text{CH}_2\text{-OH}$ generando respectivamente los fragmentos de m/z 391 y 421.

1.3.2. Análisis por CLAE-UV-ESI-MS/MS del ácido alfitólico

Fue sometido a análisis el patrón secundario de ácido alfitólico aislado desde el EAE (confirmado por RMN) obteniéndose en CLAE un pico de tiempo de retención de 24,3 min. Desde éste fue adquirido el espectro de masas MS^1 observando en él dos iones mayoritarios correspondientes a $[\text{M-H}]^-$ y $[2\text{M-H}]^-$ de m/z 471 y 944, respectivamente.

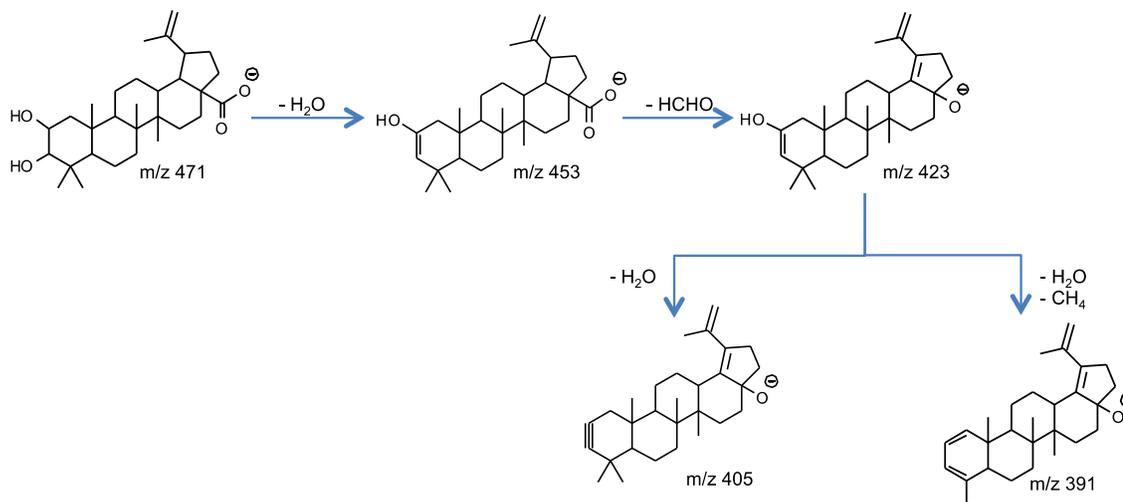


Figura 18: Ruta de fragmentación ESI-MS propuesta para el $[\text{M-H}]^-$ de ácido alfitólico

El espectro MS^2 del ion molecular $[\text{M-H}]^-$ (Anexo 2.2) mostró 5 fragmentos principales que se detallan en la Tabla 6. Estos corresponderían a pérdidas de H_2O , posible descarbonilación-deshidrogenación y eliminación de un metilo como CH_4 .

1.3.3. Análisis por CLAE-UV-ESI-MS/MS del ácido corosólico

Se observó en el espectro de masas MS^1 una señal intensa correspondiente al ión molecular $[M-H]^-$ de m/z 471,4, además de dos aductos de m/z 944 y 986 correspondientes respectivamente a $[2M-H]^-$ y a $[2M+HCOOH-4H]^-$.

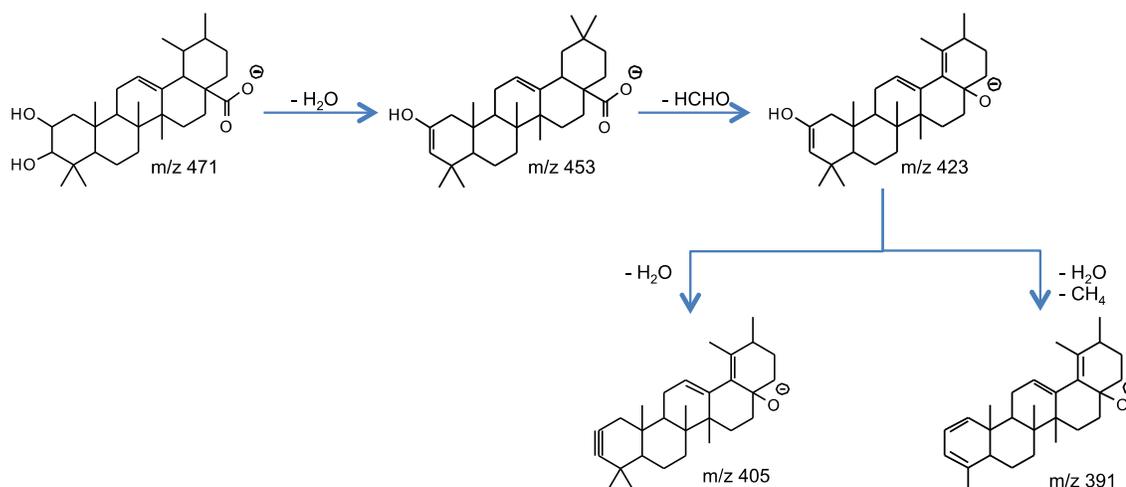


Figura 19: Ruta de fragmentación ESI-MS propuesta para $[M-H]^-$ ácido corosólico

El espectro MS^2 mostró una señal de 423 m/z correspondiente a la pérdida de H_2O y formaldehído. Se observaron también señales que muestran fragmentos cuyas pérdidas corresponden a H_2O y CH_4 (Figura 19).

1.3.4. Análisis por CLAE-UV-ESI-MS/MS del ácido oleanólico

El espectro MS^1 en modo de ión negativo (Anexo 2.4.) muestra un único ión correspondiente al ión molecular $[M-H]^-$ de m/z 455, del cual al obtener su espectro de fragmentación MS^2 observamos un fragmento de m/z 407. Previamente, Li y cols. (2009) (partiendo de un extracto del níspero *Eriobotrya japonica*) describieron un fragmento MS^2 tanto para el $[M-H]^-$ del ácido oleanólico como de su isómero el ácido ursólico de m/z 411 correspondiente a $[M-H-CO_2]^-$. Este fragmento no fue detectado en los análisis aquí descritos para el espectro de fragmentación MS^2 del patrón primario,

encontrándose un fragmento a m/z 407. Sin embargo, recientemente Chen y cols. (2011) también observaron el fragmento de m/z 407 tanto para ácido ursólico como oleanólico y lo definieron como $[M-H-HCHO-H_2O]^-$ (Figura 20), propuesta que es congruente con los resultados obtenidos bajo las condiciones experimentales configuradas para esta investigación.

1.3.5. Análisis por CLAE-UV-ESI-MS/MS de la co-elución de los ácidos oleanólico y ursólico

Se inyectó al sistema CLAE-UV-ESI-MSⁿ una mezcla de los ácidos oleanólico y ursólico (Figura 20), obteniéndose un único pico cuyo tiempo de retención fue idéntico al del patrón primario de ácido oleanólico (51,8 min). Se observó también que la fragmentación MS¹ y MS² de esta mezcla de triterpenoides (Anexo 2.5.) es completamente coincidente con la del patrón primario del ácido oleanólico. La similitud de las polaridades de estos dos isómeros estructurales resulta en un tiempo de retención idéntico bajo las condiciones de la CLAE que se establecieron para este análisis descriptivo.

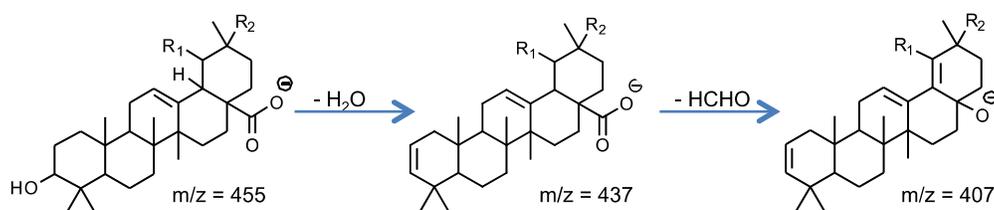


Figura 20: Ruta de fragmentación ESI-MS propuesta para los $[M-H]^-$ de los ácidos oleanólico (R_1 : H y R_2 : CH_3) y ursólico (R_1 : CH_3 y R_2 : H)

Tabla 6: Tabla de iones MS¹ y de fragmentos MS² de [M-H]⁻ de distintos estándares de triterpenoides pentacíclicos, obtenidos por CLAE-UV-ESI-MS/MS

Estándar	Tr (min)	MS ¹ (m/z)	Fragmentos MS ² (m/z)
Ácido asiático	7,8	487 [M-H] ⁻	439 391 421 409
		523 [M+Cl] ⁻	487
		976 [2M-H] ⁻	487
Ácido alfitólico	24,3	471 [M-H] ⁻	453 425 407 390
		944 [2M-H] ⁻	471
		966 [2M+Na-H] ⁻	471
Ácido corosólico	26,8	471 [M-H] ⁻	451 423 407 391
		944 [2M-H] ⁻	471
		966 [2M+Na-H] ⁻	471
Co-elución de los ácidos oleanólico y ursólico	51,5	455 [M-H] ⁻	407 437
Ácido oleanólico	51,8	455 [M-H] ⁻	407 439

1.3.6. Caracterización del EAE, EET y SAE por CLAE-UV-ESI-MS/MS

Se observa en el perfil cromatográfico por CLAE obtenido para el EAE (Figura 22 A) la presencia de al menos 9 compuestos cuyos espectros de masas MS^1 y MS^2 para $[M-H]^-$ se pueden observar en el Anexo 5 y cuyos fragmentos más relevantes se detallan en la Tabla 7.

Tabla 7: Tabla de iones MS^1 y de fragmentos MS^2 de $[M-H]^-$ de los distintos compuestos presentes en el cromatograma por CLAE-UV de EAE

Pico	Tr (min)	m/z		$MS^2 [M-H]^-$					
		MS^1							
1	5,2	504 [M-H] ⁻	540 [M+Cl] ⁻	455	437	423	407	389	Ácido madecásico
2	7,5	487 [M-H] ⁻	523 [M+Cl] ⁻	976 [2M-H] ⁻	441	423	409	393	Ácido asiático
3	10,5	487 [M-H] ⁻	523 [M+Cl] ⁻	975 [2M-H] ⁻	441	423	393		n.i.
4	22,9	471 [M-H] ⁻	507 [M+Cl] ⁻	943 [2M-H] ⁻	425	405	393		n.i.
5	24,3	471 [M-H] ⁻		944 [2M-H] ⁻	425	405	393		Ácido alfitólico
6	26,8	471 [M-H] ⁻		944 [2M-H] ⁻	423	409	393		Ácido corosólico
7	29,1	471 [M-H] ⁻	507 [M+Cl] ⁻	944 [2M-H] ⁻	423	405	393		Ácido maslínico
8	49,6	455 [M-H] ⁻			437	419	395		Ácido betulínico
9	51,2	455 [M-H] ⁻			439	407			Ácidos oleanólico y ursólico

En base a los antecedentes entregados por el análisis por CLAE-UV-ESI-MS/MS para los patrones anteriormente discutidos, hemos podido identificar la presencia de los ácidos asiático (pico 2) y alfitólico (pico 5) y los ácidos ursólico y oleanólico (pico 9).

Se observó también la presencia del ácido corosólico (pico 6) a un tiempo de retención de 26,8 min cuyo patrón de fragmentación es coincidente con los fragmentos reportados en literatura de m/z 423 y 409 (Li y cols., 2009). Al tiempo de retención 29,1 min se pudo observar la presencia de un triterpenoide no identificado para esta especie (pico 7) el cual presenta un patrón de fragmentación idéntico al del ácido corosólico (Anexo 3.6. y 3.7.) y que podría corresponder al isómero estructural de este último, el ácido maslínico (Figura 21) cuyos fragmentos fueron reportados por Li y cols. (2009) en su estudio de *Eriobotrya japonica*. La presencia de este triterpenoide fue confirmada por completos estudios de RMN.

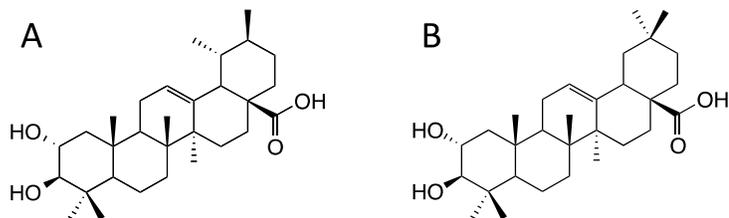


Figura 21: Ácidos corosólico (A) y maslínico (B)

1.3.7. Caracterización por CLAE-UV-ESI-MS/MS de SAE y EET

Fueron inyectados al sistema de CLAE-UV-ESI-MSⁿ 3 mg/mL y 10 mg/mL del SAE y EET, respectivamente. Se pudo observar que existe equivalencia en cuanto a los perfiles cromatográficos de triterpenoides de ambos extractos y que el SAE es un sub-extracto de EET rico en triterpenoides. Las figuras 19 B y 19 C demuestran que se conservó la composición de los triterpenoides ácidos madecásico, asiático, corosólico, maslínico y mezcla de los ácidos ursólico y oleanólico.

Se observó en el perfil cromatográfico que el proceso de purificación de EET permitió concentrar los triterpenoides removiendo en gran parte el contenido de fenoles (Figura 22 C), como se pudo determinar mediante la reacción de Folin-Ciocalteu y posteriormente confirmado con la estandarización química de los extractos, como se detalla en 1.4.

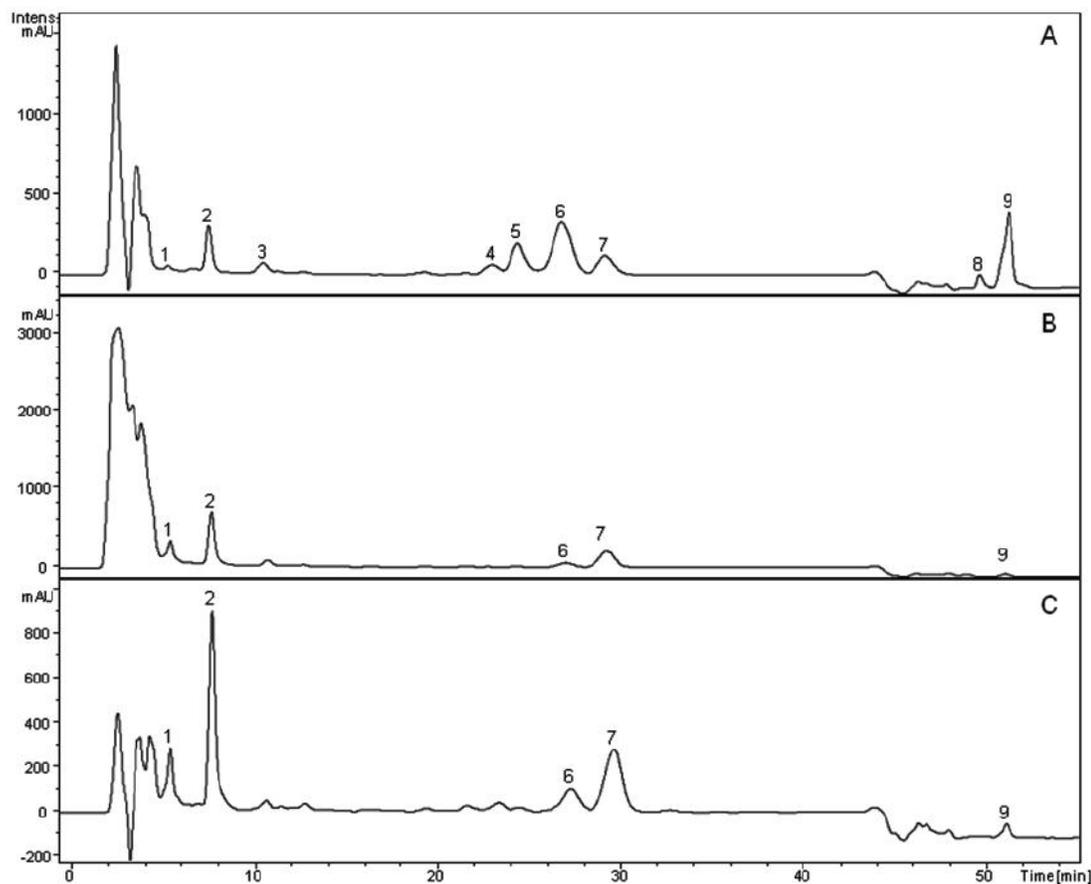


Figura 22: Cromatogramas por CLAE-UV a 201 nm de EAE 3 mg/mL (A); EET 10 mg/mL (B) y SAE 3 mg/mL.

1: ácido madecásico; 2: ácido asiático; 3: no identificado; 4: no identificado; 5: ácido alfitólico; 6: ácido corosólico; 7: ácido maslínico; 8: ácido betulínico; 9: co-elución de ácidos ursólico y oleanólico

Se confirmó la presencia del ácido madecásico (pico 1) en los extractos, como fue reportada en el estudio de RMN del compuesto U7 aislado desde SAE. La Figura 23 muestra la ruta de fragmentación propuesta de acuerdo a los espectros MS¹ y MS² para el pico 1.

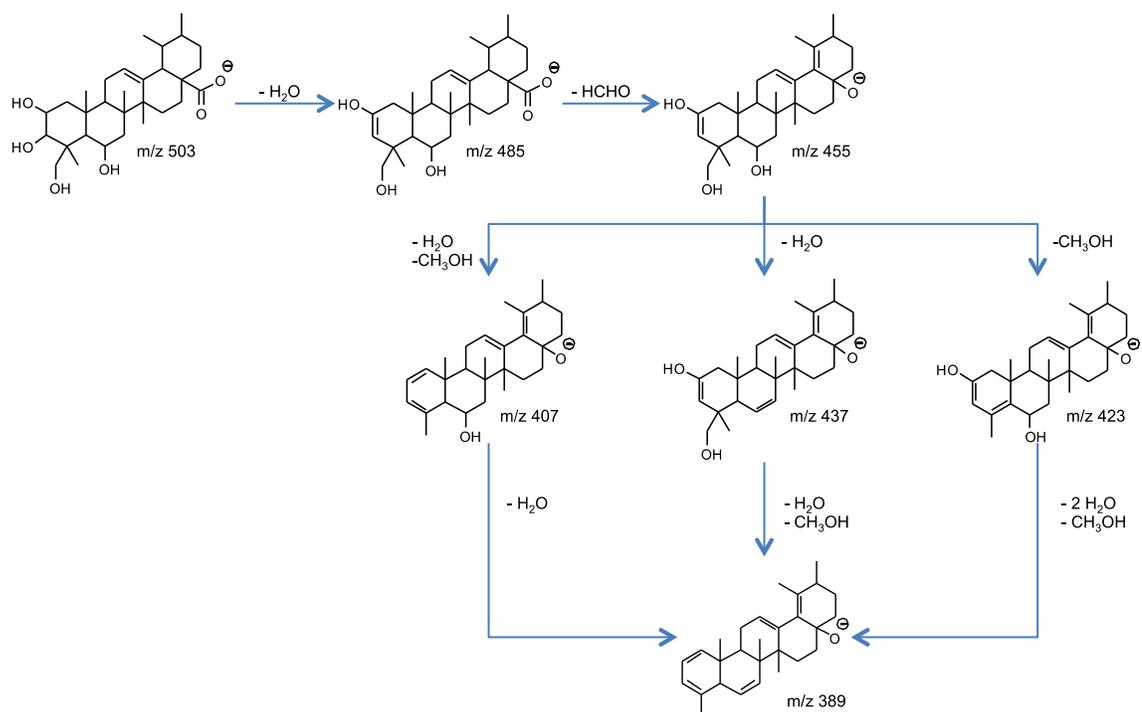


Figura 23: Ruta de fragmentación ESI-MS propuesta para el ácido madecásico

1.4. Estandarización química de extractos de *U. molinae* por cromatografía de líquidos de alta eficiencia

Los distintos triterpenoides presentes en los extractos poseen diferentes polaridades. Sobre esta base fueron clasificados en dos grupos: un grupo de mediana polaridad, constituido por los ácidos madecásico, asiático, alfitólico, corosólico y maslínico y un grupo de baja polaridad, constituido por los ácidos betulínico, ursólico y oleanólico. La separación del primer grupo se logró al emplear como fase móvil la mezcla acetonitrilo – ácido fórmico 0,1% (60 : 40) a un flujo de 0,6 mL/min en una columna de gel de sílice octadecil-silanizada (250 mm x 4 mm) (Figura 24) y la elución del segundo grupo se logró al eluir a través de la misma fase estacionaria con una mezcla de acetonitrilo – ácido fórmico 0,1% (75 : 25) a un flujo de 0,7 mL/min (Figura 25).

Se obtuvieron curvas de calibración para los patrones primarios en un intervalo de 10 a 200 µg/mL (Anexo 3) y se establecieron los tiempos de retención para cada uno de acuerdo a las condiciones cromatográficas correspondientes (Tabla 8):

Tabla 8: Curvas de calibración para los patrones primarios de ácidos madecásico, asiático, maslínico, betulínico, ursólico y oleanólico

	Tr ± SD	Ecuación	r ²
Ácido madecásico ^a	6,42 ± 0,01	Área = 18780 C + 14630	0,9987
Ácido asiático ^a	8,96 ± 0,01	Área = 18910 C + 6218	0,9985
Ácido maslínico ^a	31,81 ± 0,25	Área = 27700 C - 160100	0,9949
Ácido betulínico ^b	32,87 ± 0,08	Área = 23181 C - 15440	0,9941
Ácido oleanólico ^b	36,51 ± 0,08	Área = 29041 C - 210301	0,9897
Ácido ursólico ^b	37,93 ± 0,14	Área = 18810 C - 29820	0,9990

Tr: tiempo de retención (min); C: concentración del estándar expresada en µg/mL. ^a acetonitrilo - ácido fórmico 0,1% (60 : 40); 0,6 mL/min; ^b acetonitrilo - ácido fórmico 0,1% (75 : 25); 0,7 mL/min

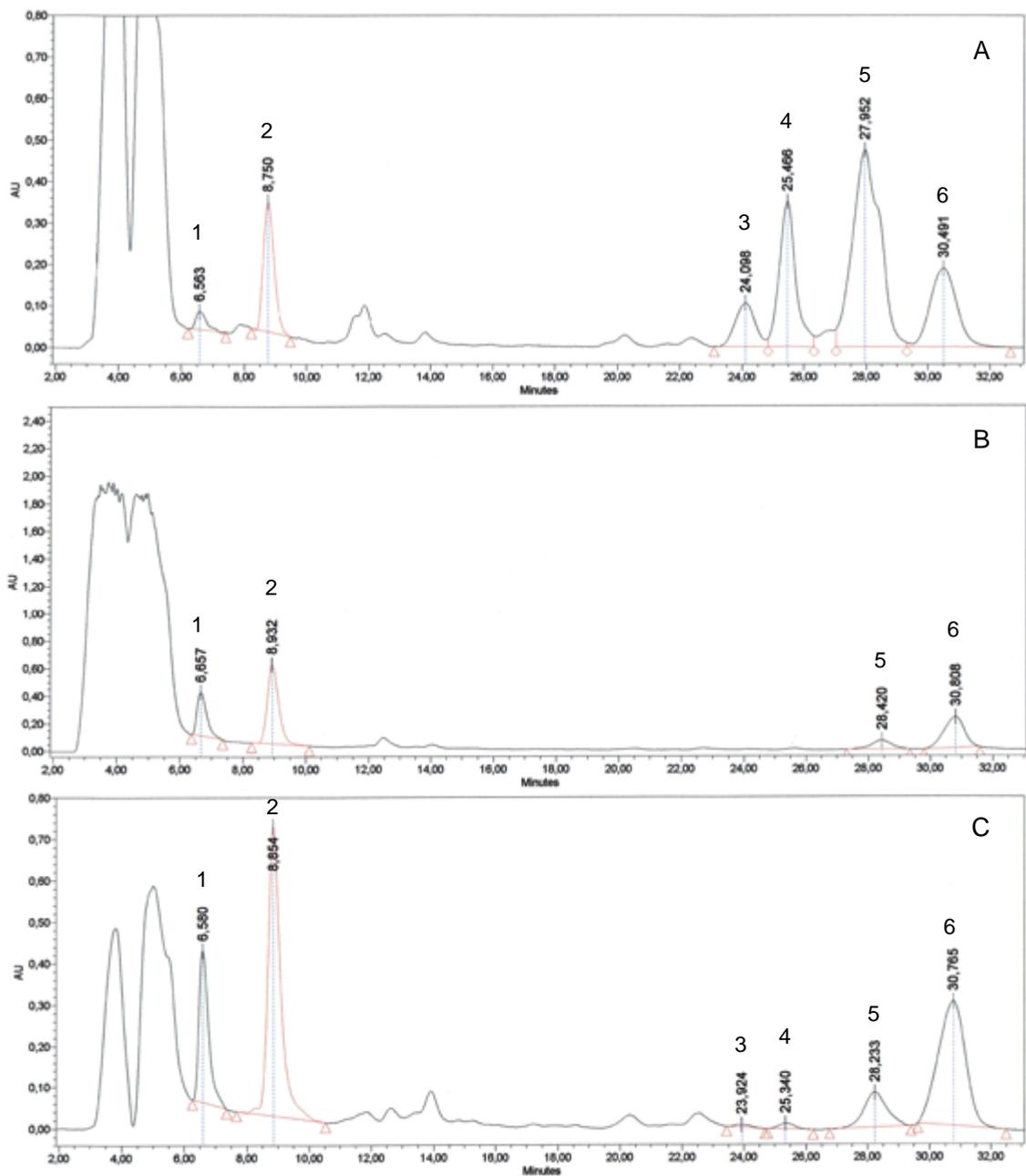


Figura 24: Cromatogramas por CLAE-DAD 201 nm de EAE 5 mg/mL (A), EET 10 mg/mL (B) y SAE 5 mg/mL (C).

1: ácido madecásico; 2: ácido asiático; 3: compuesto no identificado; 4: ácido alfitólico; 5: ácido corosólico; 6: ácido maslínico. Acetonitrilo - ácido fórmico 0,1% (60 : 40); 0,6 mL/min; Hibar Purospher Star RP-18 (250 mm x 4 mm I.D.; tamaño de partícula: 5 µm).

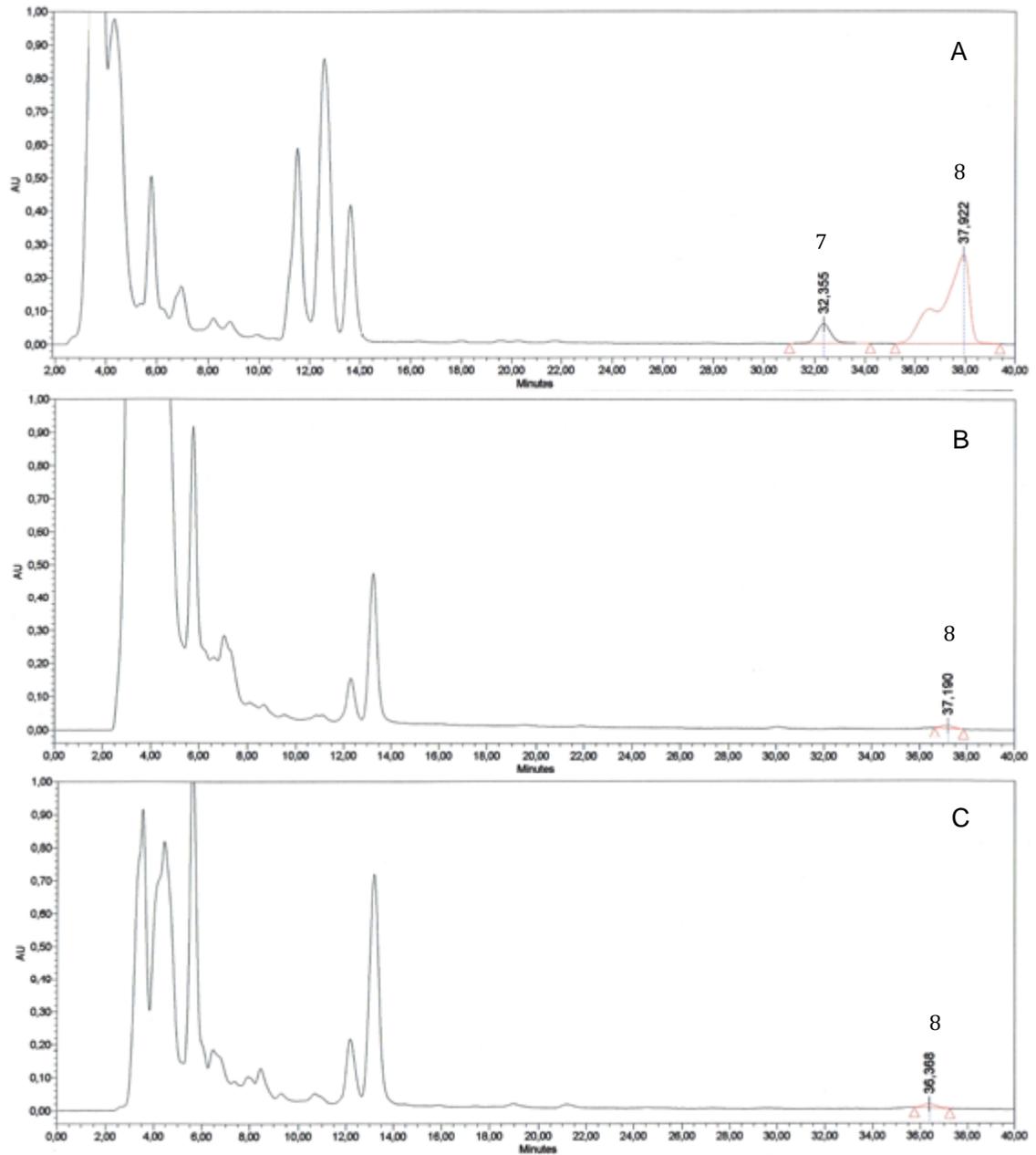


Figura 25: Cromatogramas por CLAE-DAD 201 nm de EAE 5 mg/mL (A), EET 10 mg/mL (B) y SAE 5 mg/mL (C). 7: ácido betulínico; 8: mezcla de los ácidos oleanólico y ursólico.

Acetonitrilo - ácido fórmico 0,1% (75 : 25); 0,7 mL/min; Hibar Purospher Star RP-18 (250 mm x 4 mm I.D.; tamaño de partícula: 5 µm).

Con las ecuaciones de las rectas de calibración para los patrones primarios se obtuvo la concentración de los triterpenoides en EET, SAE y EAE, detalladas en Tabla 9.

Tabla 9: Estandarización química de EET, SAE y EAE en sus principales triterpenoides pentacíclicos

	Concentración (% p/p de extracto seco)		
	EET	SAE	EAE
Ácido madecásico	3,6 ± 0,1	8,4 ± 0,5	1,1 ± 0,3
Ácido asiático	7,3 ± 0,1	20,6 ± 1,2	8,1 ± 0,3
Ácido alfitólico*	0,2 ± 0,0	0,4 ± 0,0	9,4 ± 0,3
Ácido corosólico**	1,6 ± 0,0	4,9 ± 0,3	27,6 ± 0,7
Ácido maslínico	4,0 ± 0,2	14,6 ± 0,8	7,5 ± 0,4
Ácido betulínico	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	1,8 ± 0,0
Ácidos oleanólico y ursólico**	0,3 ± 0,0	0,8 ± 0,0	20,9 ± 0,2

Los valores corresponden a la concentración promedio de la obtenida en seis determinaciones.
 * Concentración expresada en ácido betulínico; ** Concentración expresada en ácido ursólico.

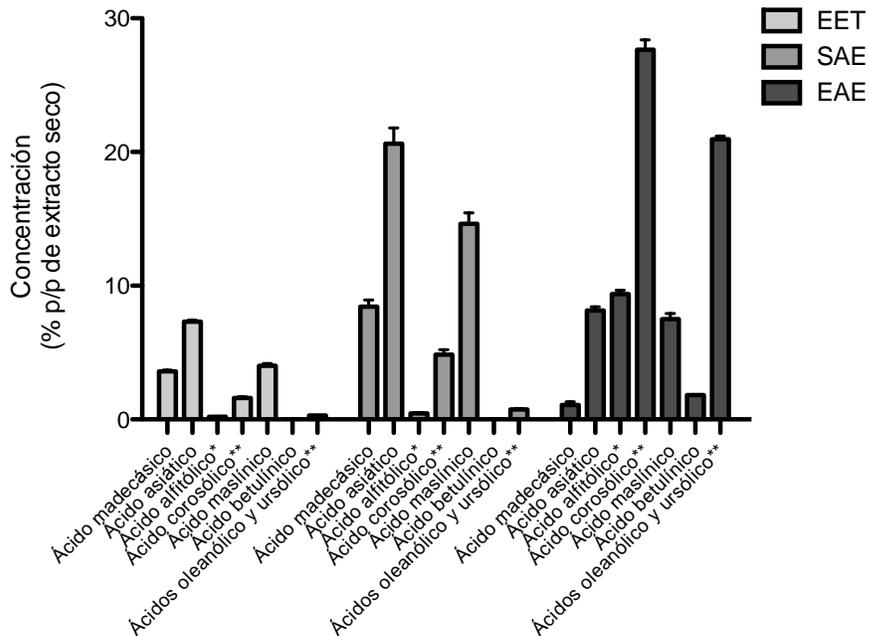


Figura 26: Estandarización química de EET, SAE y EAE en sus principales triterpenoides pentacíclicos.

Los valores corresponden al promedio de la concentración obtenida en seis determinaciones ± SD. * Concentración expresada en ácido betulínico; ** Concentración expresada en ácido ursólico.

Se observó que la obtención de SAE a partir del EET logró concentrar alrededor de tres veces la cantidad de triterpenoides que se encontraban en el extracto etanólico, obteniendo una fracción rica en 4 triterpenoides: los ácidos madecásico ($8,4 \pm 0,5\%$ p/p), asiático ($20,6 \pm 1,2\%$ p/p), corosólico ($4,9 \pm 0,3\%$ p/p) y maslínico ($14,6 \pm 0,8\%$ p/p).

El EAE, contiene una mayor variedad de triterpenoides que el SAE, siendo mayoritarios el ácido corosólico ($27,6 \pm 0,7\%$ p/p) y la mezcla de los ácidos oleanólico y ursólico ($20,9 \pm 0,2\%$ p/p) de baja polaridad la cual, por normalización aproximada de áreas bajo la curva para cada pico no resuelto de los ácidos oleanólico (36,6 min) y ursólico (37,9 min), se puede estimar que se encuentran en una proporción cercana a 30:70, respectivamente (Figura 27).

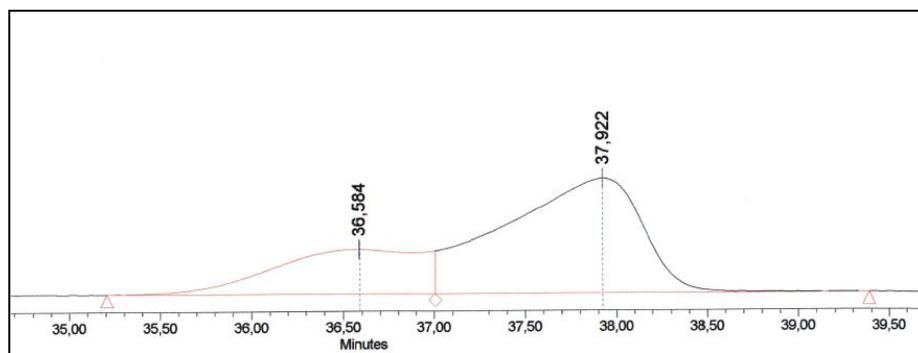


Figura 27: Co-elución por CLAE de los ácidos oleanólico (36,6 min) y ursólico (37,9 min) EAE (5 mg/mL).

Acetonitrilo - ácido fórmico 0,1% (75 : 25); 0,7 mL/min; Hibar Purospher Star RP-18 (250 mm x 4 mm I.D.; tamaño de partícula: 5 μ m).

Además se encuentran en el EAE los ácidos alfitólico, asiático y maslínico en concentraciones de $9,4 \pm 0,3$, $9,1 \pm 0,3$ y $7,5 \pm 0,4\%$, respectivamente.

1.5. Determinación de la cantidad de fenoles totales mediante la reacción de Folin-Ciocalteu

Para determinar la cantidad de fenoles totales presentes en los extractos de *U. molinae* expresados como ácido gálico fue necesario establecer una curva de calibración (Anexo 4) con este patrón primario de la cual se obtuvo la siguiente ecuación:

$$A = 0,0014C + 0,001$$

donde A es la absorbancia a 765 nm y C la concentración de ácido gálico expresado en $\mu\text{g/mL}$.

De este modo se determinó que el EET posee cerca de 3 veces más compuestos fenólicos que SAE y EAE ($130,6 \pm 0,4$ y $143,6 \pm 0,3$ mg equivalentes de ácido gálico por g de extracto seco, respectivamente) con $377,6 \pm 0,3$ mg equivalentes de ácido gálico por g de extracto seco.

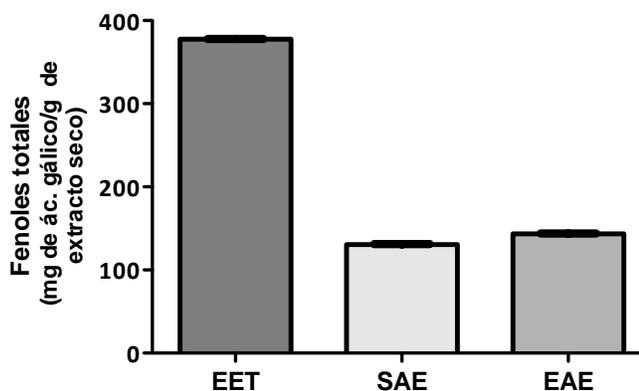


Figura 28: Cantidad de fenoles totales en EET, SAE y EAE de *U. molinae* expresados como mg de ácido gálico por g de extracto seco

La menor cantidad de compuestos fenólicos en el SAE se debería a la abundancia de glicósidos de flavonoides y taninos del EET, que fueron removidos por la purificación con agua del extracto mediante un aparato de Soxhlet. Gran parte de la

masa del EET estaría constituida por los glucósidos, ramnósidos y xilósidos de flavonoides descritas por Rubilar y cols. (2005) y confirmados por Shene y cols. (2012) mediante un análisis por CLAE-DAD-MSⁿ de extractos hidro-alcohólicos del material vegetal. Además se pudo confirmar de manera visual la abundante presencia tanto de taninos gálicos como condensados al obtener luego de la extracción acuosa una suspensión de flobafenos y un sobrenadante que generaba coloración negro-azulada en presencia de FeCl₃.

La cantidad de compuestos fenólicos remanentes tanto en el SAE como el EAE se debería principalmente a las agliconas de miricetina, quercetina y catequina/epicatequina, cuya presencia ha sido descrita por los autores antes mencionados.

2. Estudios farmacológicos

2.1. Evaluación de la actividad anti-inflamatoria tópica

La actividad anti-inflamatoria tópica determinada en el modelo de edema de oreja de ratón inducida por TPA fue de $43,3 \pm 4,2\%$ a una dosis de 1 mg de SAE. En estudios previos las misma dosis de EAE y EET exhibieron respectivamente $83,1 \pm 3,2$ y $78,3 \pm 11,8\%$ de efectos (Aguirre y cols., 2006). El efecto fue estadísticamente significativo comparado con el grupo control. Fue evaluada por primera vez en este modelo la actividad anti-inflamatoria del ácido madecásico el cual demostró tener una DE_{50} de $0,11 \mu\text{mol}$ (Tabla 10), menor a la del fármaco de referencia, aunque este último fue más eficaz. Los dos triterpenoides mayoritarios de esta fracción también se encuentran en extractos bioactivos de otras especies medicinales como *Centella asiatica* (Rumalla y cols., 2010), cuyos efectos anti-inflamatorios también han sido atribuidos a estos compuestos presentes en cantidades considerables en sus extractos estandarizados (Rafamantanana y cols., 2009). De este modo, es posible atribuir en parte el efecto anti-inflamatorio de SAE a la presencia de los ácidos madecásico, asiático, corosólico y maslínico, puesto que los ácidos asiático, corosólico y maslínico han mostrado DE_{50} de $0,13$, $0,19$ y $0,27 \mu\text{mol}$ respectivamente (Aguirre y cols., 2006; Banno y cols., 2004; Banno y cols., 2005).

Tabla 10: Tabla dosis-efecto de la actividad anti-inflamatoria tópica de ácido madecásico e indometacina en modelo de edema de oreja de ratón inducido por TPA

Dosis (μmol)	% AT \pm SEM	
	Ácido madecásico	Indometacina
1,6	84,1 \pm 10,0*	n.e.
1,4	n.e.	92,9 \pm 13,0*
0,8	70,5 \pm 8,5*	n.e.
0,7	69,8 \pm 6,5*	71,7 \pm 11,3*
0,4	n.e.	48,2 \pm 17,1*
0,2	61,1 \pm 6,2*	19,8 \pm 9,4*
0,1	55,8 \pm 7,2*	n.e.

Cada valor representa la mediana \pm SEM de los resultados obtenidos ($n = 8$); * $P \leq 0,05$ demuestra que existe diferencia significativa entre el grupo tratado y el grupo control (100 % de inflamación); n.e. no ensayado.

Si bien la Figura 29 muestra que existiría una tendencia a un efecto inferior por parte de SAE comparado con los dos extractos, el análisis estadístico de comparaciones múltiples de Dunn no encontró diferencias significativas.

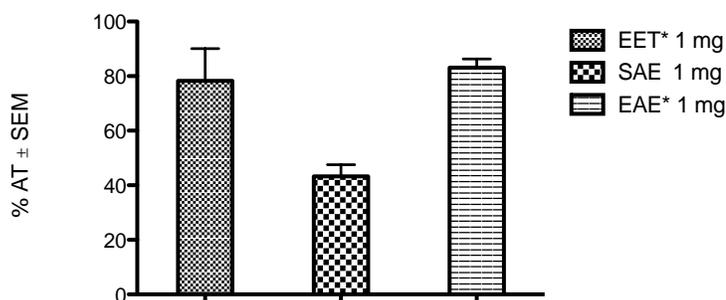


Figura 29: Efecto anti-inflamatorio tópico del EAE, SAE y EET a una dosis de 1 mg en modelo de edema de oreja de ratón inducido por TPA.

* Aguirre y cols. (2006), % AT: Efecto anti-inflamatorio tópico

Se ha demostrado que los taninos hidrolizables son capaces de inhibir la producción de hidroperóxidos inducida por TPA (Gali y cols., 1992; Noro y cols., 1999), lo cual podría explicar en parte el aparente mayor efecto anti-inflamatorio del EET con respecto al SAE. Además, Rubilar y cols. (2005) demostraron que las hojas de *U. molinae* son una rica fuente de fenoles antioxidantes: glucósidos de quercetina, canferol y miricetina junto con su genina, presentes en EET, EAE y SAE como fue confirmado en el punto 1.5. por el método de Folin-Ciocalteu. Estos compuestos son ampliamente conocidos por sus actividades anti-inflamatorias y analgésicas (Middleton y cols., 2000; Toker y cols., 2004), por lo que su contribución al efecto aquí observado es esperable. Del mismo modo, Parveen y cols. (2007) demostraron que el canferol y su 3-O-glucósido poseen efectos anti-inflamatorio y analgésico dependientes de la dosis. Estos flavonoides han sido descritos para la especie y su abundante presencia en el EET podría explicar la mayor actividad de dicho extracto.

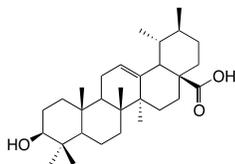
En cuanto al EAE, la mayor diversidad y cantidad de triterpenoides podría contribuir a explicar su importante efecto, puesto que se ha demostrado en el mismo modelo que los ácidos corosólico, alfitólico, oleanólico y ursólico poseen una DE_{50} de

0,19, 0,20, 0,65 y 0,21 μmol respectivamente (Aguirre y cols., 2006; Banno y cols., 2004; Banno y cols., 2005; Gali y cols., 1992; Yasukawa y cols., 1995).

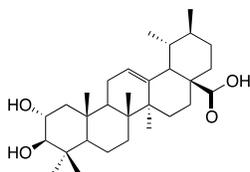
Se ha establecido que el TPA induce inflamación por activación de la ruta molecular del NF- κ B (Ban y cols., 2009). Esto se correlaciona con el efecto anti-inflamatorio *in vivo* del ácido madecásico que hemos determinado ya que los estudios previos de este triterpenoide muestran que inhibe la iNOS, COX-2, TNF- α , IL-1 β , e IL-6 mediante una regulación negativa de NF- κ B (Won y cols., 2010a). Tanto los resultados aquí obtenidos como los datos de la bibliografía muestran que los ácidos triterpenoides pentacíclicos 2 α -hidroxilados (ácidos alfitólico, asiático, corosólico, madecásico y maslínico en este caso) son más potentes que indometacina como agentes anti-inflamatorios y que la presencia de un hidroxilo en C-2 en los esqueletos derivados del lupano, ursano y del oleanano conducen a un aumento en su actividad. Además, la presencia de hidroxilos en los esqueletos del ursano en C-6 y C-23 incrementa la actividad observada para el ácido corosólico (Figura 30).

Respecto a los triterpenoides derivados del ursano y del oleanano pudimos concluir que la di-metilación en C-20 disminuye su potencia, como se observó al comparar la potencia de los ácidos oleanólico y maslínico con sus respectivos isómeros estructurales los ácidos ursólico y corosólico. Es importante destacar que la diferencia en la potencia anti-inflamatoria tópica entre los ácidos maslínico y corosólico es menor que la existente entre los ácidos oleanólico y ursólico, por lo que se confirma el importante rol que cumpliría el grupo hidroxilo en C-2.

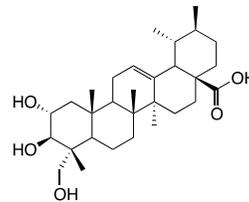
Derivados del ursano



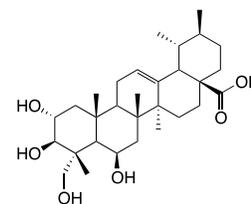
Ácido ursólico
ácido 3 β -hidroxi-urs-12(13)-en-28-oico
DE₅₀ 0,21 μ mol



Ácido corosólico
ácido 2 α -3 β -dihidroxi-urs-12(13)-en-28-oico
DE₅₀ 0,19 μ mol

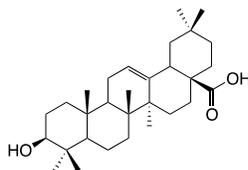


Ácido asiático
ácido 2 α -3 β -23-trihidroxi-urs-12(13)-en-28-oico
DE₅₀ 0,13 μ mol

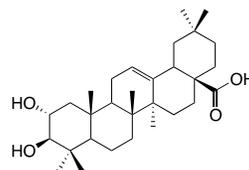


Ácido madecásico
ácido 2 α -3 β -6 β -23-tetrahidroxi-urs-12(13)-en-28-oico
DE₅₀ 0,11 μ mol

Derivados del oleanano

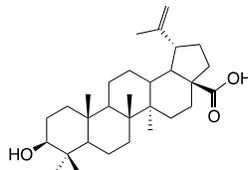


Ácido oleanólico
ácido 3 β -hidroxi-olean-12(13)-en-28-oico
DE₅₀ 0,65 μ mol

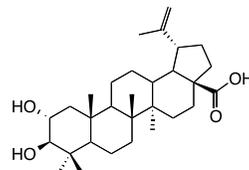


Ácido maslínico
ácido 2 α -3 β -dihidroxi-olean-12(13)-en-28-oico
DE₅₀ 0,27 μ mol

Derivados del lupano



Ácido betulínico
ácido 3 β -hidroxi-lup-20(29)-en-28-oico
DE₅₀ 0,66 μ mol



Ácido alfitólico
ácido 2 α -3 β -dihidroxi-lup-20(29)-en-28-oico
DE₅₀ 0,20 μ mol

Figura 30 Estructuras de los ácidos ursólico, corosólico, asiático, madecásico, oleanólico, maslínico, betulínico y alfitólico y sus correspondientes DE₅₀ frente al modelo de inflamación de oreja de ratón inducida por TPA (Aguirre y cols., 2006; Banno y cols., 2005; Goity y cols., 2013)

2.2. Evaluación de las actividades anti-inflamatoria, antioxidante y anti-adipogénica en modelos celulares

2.2.1. Viabilidad celular

Para realizar los ensayos farmacológicos en modelos celulares fue necesario determinar las concentraciones que no resultaran tóxicas para las células durante el período de exposición a las muestras en estudio. Conocidos son los efectos citostáticos y anti-proliferativos de algunos triterpenoides pentacíclicos sobre células tumorales (Hsu y cols., 2005; Reyes-Zurita y cols., 2011; Thurnher y cols., 2003; Yasukawa y cols., 1995; Pisha y cols., 1995), los cuales a determinadas concentraciones podrían influir en el normal desarrollo de líneas celulares como las aquí empleadas.

De este modo, se llevó a cabo el ensayo de MTS para evaluar la viabilidad celular frente a una exposición de cuatro concentraciones de triterpenoides por al menos 24 horas en las condiciones de cultivo. Todos los ensayos posteriores fueron realizados a concentraciones que no indujeran muerte celular, obteniendo así resultados que no fueran debidos a efectos citotóxicos.

2.2.1.1. Viabilidad de células RAW 264.7

Al cabo de 24 horas de exposición a los ácidos madecásico, asiático, corosólico, alfitólico, ursólico, oleanólico y maslínico no se observó toxicidad en todo el intervalo de concentraciones evaluadas (0,1 a 100 μ M) y del mismo modo para EAE y SAE (0,1 a 100 μ g/mL) (Figura 31).

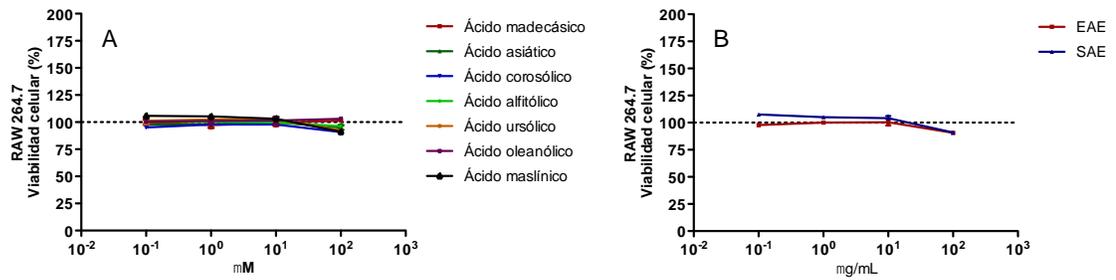


Figura 31: Viabilidad de células RAW 264.7 expuestas durante 24 horas a cuatro concentraciones distintas de triterpenoides pentacíclicos (0,1 – 100 µM) (A) y de los extractos EAE y SAE (0,1 – 100 µg/mL) (B).

Los valores en el eje de ordenadas representan los porcentajes de células vivas expuestas a las muestras respecto a la cantidad de células control \pm SD (n = 5).

Para definir claramente la concentración máxima a evaluar en los ensayos sobre esta línea de macrófagos, se realizó también un estudio de la viabilidad celular al cabo de 48 horas de exposición. Se observó que tanto para la máxima concentración evaluada de los ácidos alfitólico, corosólico, maslínico y ursólico como para la del EAE y SAE comienzan a manifestarse efectos citotóxicos (viabilidad inferior a 90%) (Figura 32).

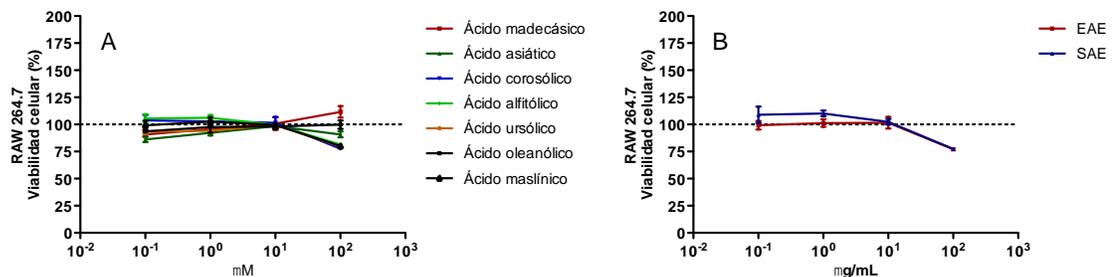


Figura 32: Viabilidad de células RAW 264.7 expuestas durante 48 horas a cuatro concentraciones distintas de triterpenoides pentacíclicos (0,1 – 100 µM) (A) y de los extractos EAE y SAE (0,1 – 100 µg/mL) (B).

Los valores presentados en el eje de ordenadas representan los porcentajes de células vivas expuestas a las muestras respecto a la cantidad de células control \pm SD (n = 5).

De este modo se estableció que la máxima concentración a evaluar en células RAW 264.7 fue de 10 µM para triterpenoides y de 10 µg/mL para el EAE y SAE, debido

a que dichas concentraciones no inducen muerte celular durante exposición al tratamiento.

2.2.1.2. Viabilidad de células 3T3-L1

El ensayo de viabilidad para las células 3T3-L1 a 24 y 48 horas permitió establecer que la concentración máxima a ser evaluada fue de 10 μ M para los triterpenoides y 10 μ g/mL para el EAE y SAE, debido a que las concentraciones de 100 μ M y 100 μ g/mL inducen muerte celular tanto para el EAE como SAE y la mayoría de los triterpenoides evaluados (Figura 33 y Figura 34).

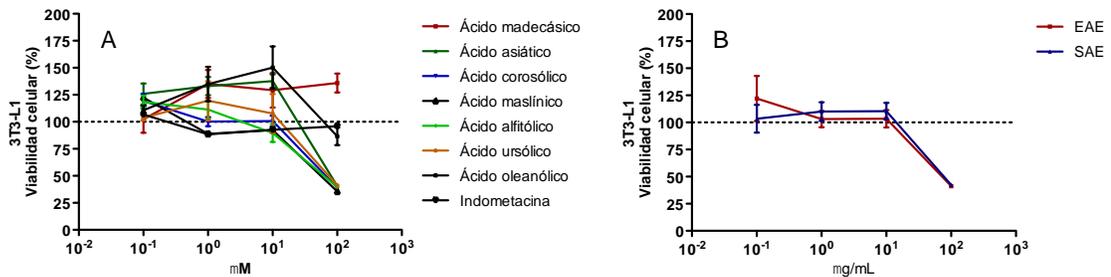


Figura 33: Viabilidad de células 3T3-L1 expuestas durante 24 horas a cuatro concentraciones distintas de triterpenoides pentacíclicos (0,1 – 100 μ M) (A) y de los extractos EAE y SAE (0,1 – 100 μ g/mL) (B).

Los valores presentados en el eje de ordenadas representan los porcentajes de células vivas expuestas a las muestras respecto a la cantidad de células control \pm SD (n = 5)

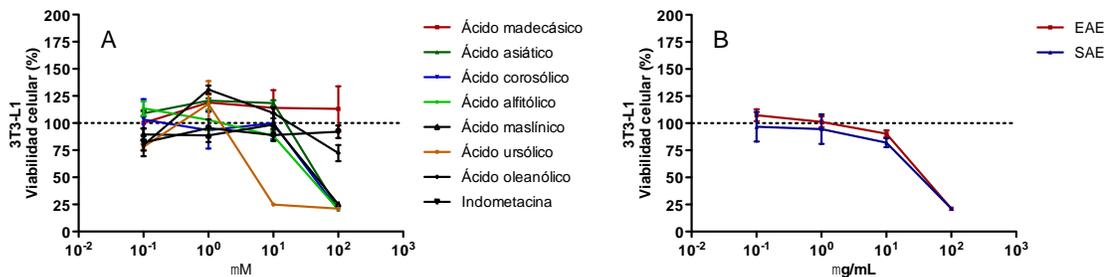


Figura 34: Viabilidad de células 3T3-L1 expuestas durante 48 horas a cuatro concentraciones distintas de triterpenoides pentacíclicos (0,1 – 100 μ M) (A) y de los extractos EAE y SAE (0,1 – 100 μ g/mL) (B).

Los valores presentados en el eje de ordenadas representan los porcentajes de células vivas expuestas a las muestras respecto a la cantidad de células control \pm SD (n = 5).

Es importante destacar que el ácido madecásico resultó ser el único triterpenoide que no exhibió citotoxicidad en ninguna de las concentraciones o períodos de exposición y además indujo la proliferación de células al encontrarse una viabilidad celular cercana al 140% al cabo de 24 horas de tratamiento a 100 μM , efecto que ya comienza a notarse a la concentración 1 μM . Los otros compuestos evaluados presentaron en nula o menor medida este efecto. Sin embargo al superar la concentración de 10 μM se observó una notable toxicidad. Como fue mencionado, las células 3T3-L1 son fibroblastos embrionarios, que por su potencialidad de diferenciarse son empleados aquí como pre-adipocitos. De este modo, el efecto observado con estos compuestos podría deberse a los efectos favorables sobre la síntesis de colágeno en fibroblastos que ha sido reportado extensamente en numerosas fuentes para extractos de *Centella asiatica* que contienen los ácidos asiático y madecásico (Bonté y cols., 1994; Maquart y cols., 1990; Maquart y cols., 1999). Se ha establecido también que tanto la conformación como la abundancia de las fibras de colágeno en la matriz extracelular son factores cruciales para una mayor proliferación de estas células (Hadjipanayi y cols., 2009).

2.2.1.3. Viabilidad de células β -TC-6

A ninguna de las concentraciones evaluadas se observó muerte celular luego de 24 horas de exposición a los siete triterpenoides y a los EAE y SAE (Figura 35).

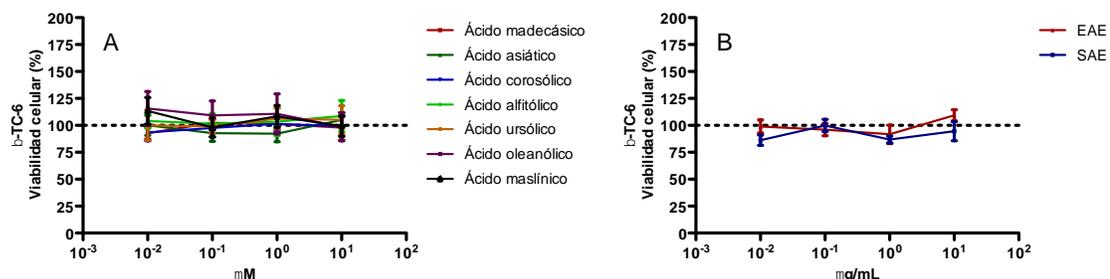


Figura 35: Viabilidad de células β -TC-6 expuestas durante 24 horas a cuatro concentraciones distintas de triterpenoides pentacíclicos (0,1 – 100 μ M) (A) y de los extractos EAE y SAE (0,1 – 100 μ g/mL) (B).

Los valores presentados en el eje de ordenadas representan los porcentajes de células vivas expuestas a las muestras respecto a la cantidad de células control \pm SD (n = 5)

Se determinó una concentración máxima de 10 μ M para los triterpenoides y de 10 μ g/mL para el EAE y SAE, siguiendo las concentraciones establecidas por la viabilidad de las otras líneas celulares para así obtener resultados comparables. Así, los triterpenoides y los EAE y SAE fueron evaluados en todas las líneas celulares a las concentraciones de 1 y 10 μ M para los compuestos purificados y de 1 y 10 μ g/mL para EAE y SAE.

2.2.2. Determinación del nivel intracelular de especies reactivas de oxígeno en macrófagos RAW 264.7 y células pancreáticas β -TC-6 estimuladas con TNF- α

El estrés oxidativo intracelular ocurre cuando la producción de las especies reactivas de oxígeno excede la capacidad de los antioxidantes celulares de neutralizarlas y es resultado tanto de la excesiva cantidad de energía disponible (James y cols., 2012) como de la respuesta inflamatoria inducida por el tejido adiposo (Dandona y cols., 2005), siendo coexistiendo ambos en el síndrome metabólico.

Diversos métodos han sido propuestos para la determinación del nivel de EROic, induciendo el estrés oxidativo principalmente con H₂O₂ (Halliwell y Whiteman, 2004). En esta tesis se propuso la modificación del método descrito por Wang y Joseph (1999), induciendo el estrés oxidativo con TNF- α .

2.2.2.1. Determinación del nivel de EROic en macrófagos RAW 264.7 estimulados con TNF- α

Tanto SAE como EAE demostraron reducir significativamente el nivel de EROic inducido por TNF- α a ambas concentraciones ensayadas (Figura 36), observándose en estos experimentos un leve pero estadísticamente significativo incremento de la actividad al aumentar diez veces la concentración de SAE y EAE (Tabla 11).

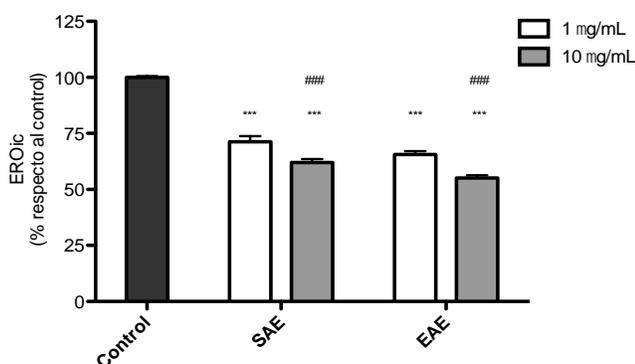


Figura 36: Nivel promedio de EROic en células RAW 264.1 inducidas con TNF- α (2 ng/mL) durante noventa min y tratadas con EAE y SAE a dos concentraciones (n = 6).

Los resultados están expresados como % EROic \pm SD respecto a control (n = 6). ***P < 0,001 vs. control, ###P < 0,001 vs concentración inferior.

Tabla 11: Porcentaje de disminución de EROic \pm SEM en células RAW 264.1 estimuladas con TNF- α y tratadas con SAE y EAE 1 μ M y 10 μ M

	% Disminución de EROic \pm SEM	
	1 μ g/mL	10 μ g/mL
SAE	28,8 \pm 2,5	38,1 \pm 2,6
EAE	34,4 \pm 4,4	44,9 \pm 4,5

Al evaluar el efecto de los triterpenoides en estudio se observó que todos disminuyen significativamente el nivel de EROic en macrófagos respecto al control (Figura 37).

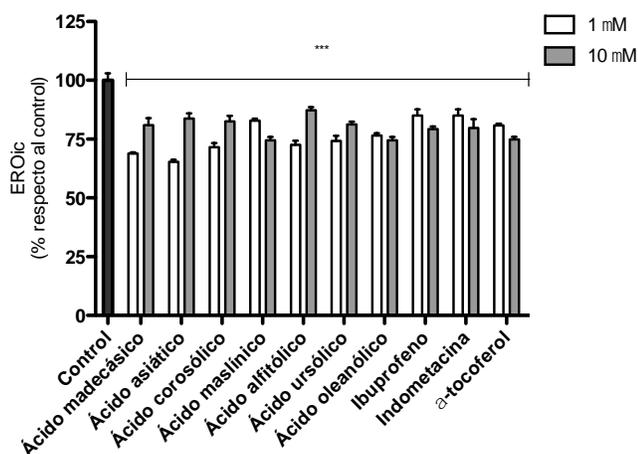


Figura 37: Nivel promedio de EROic en células RAW 264.1 inducidas con TNF- α (2 ng/mL) y tratadas con triterpenoides y fármacos de referencia a dos concentraciones (n = 6).

Los resultados están expresados como % EROic \pm SEM respecto a control (n = 12). ***P < 0,001 vs. control.

Se observó que todos los triterpenoides ensayados a una concentración 1 μ M, con la excepción del ácido maslínico, poseen una actividad superior a la observada para los fármacos de referencia (Figura 38 y Tabla 4), para los cuales previamente han sido demostradas sus actividades reductoras de especies reactivas de oxígeno por rutas independientes de la inhibición de la ciclooxigenasa, interviniendo en las cascadas de señalización conducentes a la activación de la NADPH oxidasa (Feitoza y cols., 2010; Wilkinson y cols., 2012).

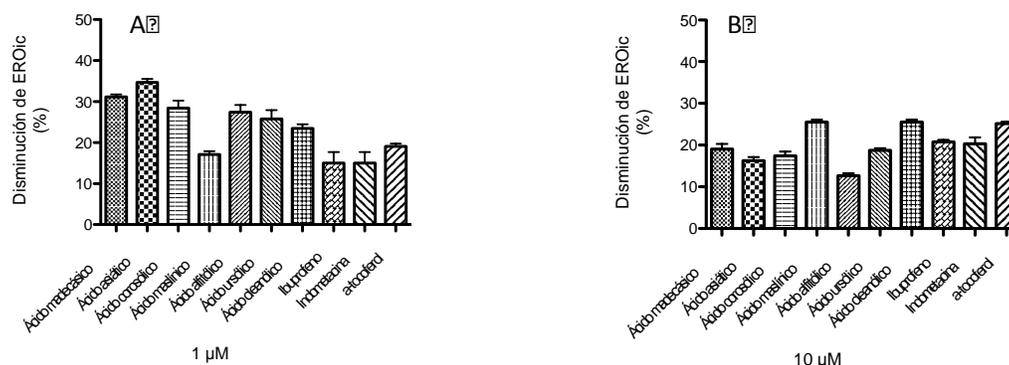


Figura 38: Porcentaje de disminución de EROic inducido en células RAW 264.1 por TNF-α 2 ng/mL y tratadas con triterpenoides o fármacos de referencia a dos concentraciones por dos horas posteriores a la inducción (n = 6).

Los resultados están expresados como % de disminución de EROic ± SEM respecto a control (n = 12). ***P < 0,001 vs. control.

Tabla 12: Porcentaje de disminución de EROic inducido en células RAW 264.1 por TNF-α 2 ng/mL y tratadas con triterpenoides o fármacos de referencia

	% Disminución de EROic ± SEM	
	1 µM	10 µM
Ácido madecásico	31,2 ± 0,6	19,0 ± 1,2
Ácido asiático	34,7 ± 0,9	16,3 ± 0,9
Ácido corosólico	28,4 ± 1,8	17,5 ± 1,0
Ácido maslínico	17,1 ± 0,8	25,5 ± 0,6
Ácido alfitólico	27,4 ± 1,8	12,7 ± 0,5
Ácido ursólico	25,8 ± 2,2	18,7 ± 0,5
Ácido oleanólico	23,5 ± 1,0	25,5 ± 0,6
Ibuprofeno	15,0 ± 2,7	20,8 ± 0,5
Indometacina	15,0 ± 2,7	20,3 ± 1,5
α-tocoferol	19,1 ± 0,7	25,1 ± 0,5

Kim y cols. (2010) describieron la ruta de generación de EROic inducida por TNF-α como una ruta de señalización intracelular que involucra la activación de la proteína moduladora de ERO (Romo1). Se podría esperar que los triterpenoides actúen modulando esta ruta, además de inhibir enzimas generadoras de EROic como la xantina oxidasa.

Se ha demostrado la capacidad de los triterpenoides derivados del ursano de suprimir la ruta del factor nuclear κB (NF-κB) en macrófagos. Esta supresión promueve efectos anti-inflamatorios al inhibir la expresión de las enzimas iNOS y COX-2 (Won y cols., 2010a; Yun y cols., 2008). Dichos efectos provocan la disminución de la

liberación de citoquinas pro-inflamatorias y la cantidad de óxido nítrico generado por iNOS. Por otro lado, Kim y cols. (2010) plantean que la muerte celular inducida por TNF- α es normalmente bloqueada por una activación concomitante de NF- κ B, puesto que la señalización de este factor nuclear induce la expresión de superóxido dismutasa dependiente de manganeso (MnSOD) y la cadena pesada de ferritina (FHC) (Pham y cols., 2004), los cuales son agentes antioxidantes intracelulares. Lo anterior se asocia a que la inhibición concomitante de NF- κ B potenciaría la vulnerabilidad de células a la apoptosis (Cardoso y Oliveira, 2003). Estos antecedentes podrían explicar la disminución del efecto atenuador del nivel de EROic mostrado por los derivados del ursano (ácidos madecásico, asiático, corosólico y ursólico) y el derivado del lupano (ácido alfitólico) al aumentar la concentración a la cual las células fueron expuestas (Figura 38), ya que es posible que un aumento de las concentraciones intracelulares de estos compuestos pudiese bloquear la ruta NF- κ B y como consecuencia disminuir la expresión de MnSOD y FHC.

Ikeda y cols. (2007) concluyeron que el ácido ursólico es capaz de inducir la generación de EROic en macrófagos no estimulados de manera dependiente de la dosis a 4 y 20 μ M, respectivamente. Observaron además que el ácido oleanólico no presenta este efecto pro-oxidante, por lo que la leve diferencia estructural entre estos isómeros es crucial en su efecto. Estas observaciones respaldan los resultados obtenidos en este ensayo, en cuanto a que los derivados del ursano disminuirían su potencia al aumentar la dosis. Se puede apreciar claramente en la Figura 39 cómo a una concentración 100 μ M el ácido ursólico, a diferencia del ácido oleanólico genera una pérdida estadísticamente significativa de la viabilidad celular ($79,6 \pm 0,9$ y $99,8 \pm 3,8\%$, respectivamente). La literatura científica ha demostrado extensamente que la generación de estrés oxidativo es conducente a daño celular y apoptosis y es esperable que este factor influya en la toxicidad de los compuestos de manera dosis- y estructura-dependiente.

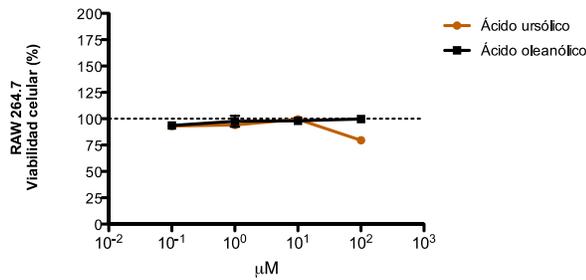


Figura 39: Viabilidad de células RAW 264.7 expuestas durante 48 horas a cuatro concentraciones distintas de los ácidos ursólico y oleanólico.

Los valores del eje de ordenadas representan los porcentajes de células vivas expuestas a las muestras respecto a la cantidad de células control \pm SD (n = 5).

Previamente, You y cols. (2001) concluyeron que el ácido ursólico en macrófagos RAW 264.7 no estimulados induce la producción de NO y TNF- α a través de la activación de NF- κ B. Estos resultados contrarios a los descritos en otros trabajos sobre macrófagos estimulados fueron justificados por los autores al proponer que el efecto de este triterpenoide sobre NF- κ B dependería del estado biológico en el cual se encuentren los macrófagos. Ikeda y cols. (2005) respaldaron lo propuesto, describiendo además un mecanismo por el cual los macrófagos no estimulados y en presencia de ácido ursólico aumentarían la liberación de IL-1 β mediante incrementos de EROic. Esta información debe ser considerada al establecer tanto la dosis como la estandarización química de un extracto en cuanto al tipo de triterpenoides presentes, puesto que una sobredosis de determinados compuestos triterpénicos podría propiciar efectos contrarios a los beneficios farmacológicos tanto en individuos sanos como en otros afectados por desórdenes metabólicos.

2.2.2.2. Determinación de los niveles de EROic en células pancreáticas β -TC-6 estimuladas con TNF- α

En este ensayo se evaluó la capacidad de las muestras de disminuir los niveles de EROic en células pancreáticas estimuladas con TNF- α , puesto que se ha demostrado que elevados niveles de este agente promueven la muerte celular por daño oxidativo debido a la inducida generación inducida de ERO desde la mitocondria (Kim y cols., 2010). La disminución de células β pancreáticas debida a apoptosis se ha hecho evidente en estudios histológicos de individuos diabéticos (Butler y cols., 2003).

Tanto SAE como EAE disminuyeron, a ambas concentraciones evaluadas, el porcentaje de EROic respecto al control en una magnitud similar a la observada en macrófagos. Se observó que la actividad de los extractos disminuyó a la concentración mayor (Figura 40).

Tabla 13: Porcentaje de disminución de EROic \pm SEM en células β -TC-6 estimuladas con TNF- α y tratadas con SAE y EAE 1 μ M y 10 μ M

	% Disminución de EROic \pm SEM	
	1 μ g/mL	10 μ g/mL
SAE	37,86 \pm 2,5	26,17 \pm 2,6
EAE	25,46 \pm 4,4	12,38 \pm 4,5

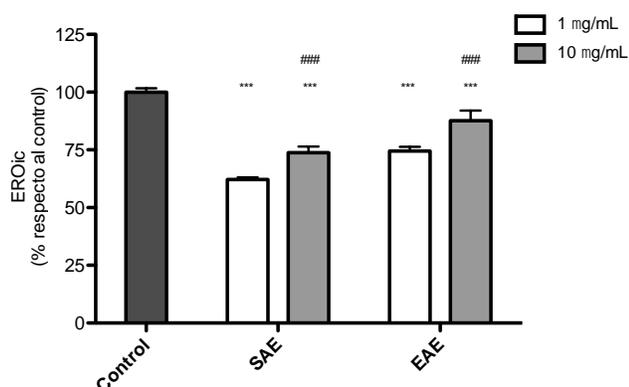


Figura 40: Nivel de EROic generadas en células β -TC-6 luego de ser inducidas con TNF- α (2 ng/mL) durante noventa minutos y tratadas con EAE y SAE a dos concentraciones por dos horas posteriores a la inducción.

Los resultados están expresados como % EROic \pm SEM respecto a control (n = 6). ***P < 0,001 vs. control, ###P < 0,001 vs. concentración inferior.

Esta disminución de actividad a mayor concentración se debería al efecto pro-oxidante atribuible a la generación de H₂O₂ a través de la interacción de compuestos fenólicos con componentes del medio de cultivo como fue descrito por Lapidot y cols. (2002) para la misma línea celular, siendo dicho estudio congruente con la composición de compuestos fenólicos de los extractos de *U. molinae*. Los mismos autores concluyen que este efecto pro-oxidante artificial puede ser reducido al co-administrar metmioglobina al medio de cultivo, para de ese modo obtener efectos protectores frente al estrés oxidativo con los compuestos fenólicos evaluados por ellos (crisina, catequina, quercetina y ácido cafeico 50 μ M).

Los triterpenoides aislados mostraron mayor actividad atenuadora de los niveles de EROic en células pancreáticas que en macrófagos (Figura 41).

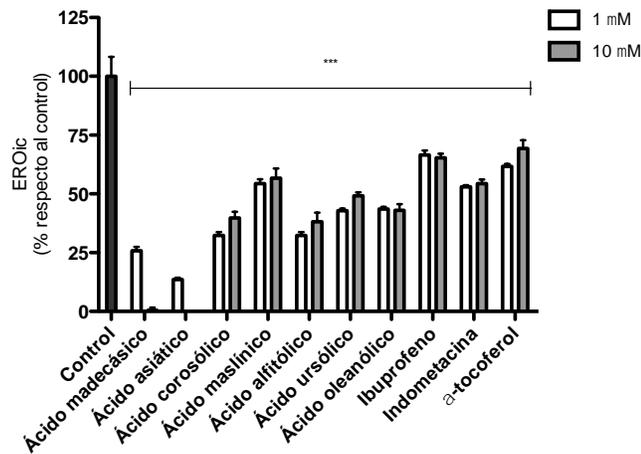


Figura 41: Nivel de EROic generadas en células β -TC-6 luego de ser inducidas con TNF- α (2 ng/mL) durante noventa minutos y tratadas con triterpenoides o fármacos de referencia a dos concentraciones por dos horas posteriores a la inducción (n = 6).

Se observó que para la mayor parte de los triterpenoides ensayados se alcanzó el efecto máximo a la concentración 1 μ M, siendo ésta equivalente a la presentada por los fármacos de referencia. Sólo los ácidos madecásico y asiático superaron el efecto de los fármacos de referencia, logrando eliminar completamente las EROic a la concentración mayor (Figura 40 y 37 y Tabla 14).

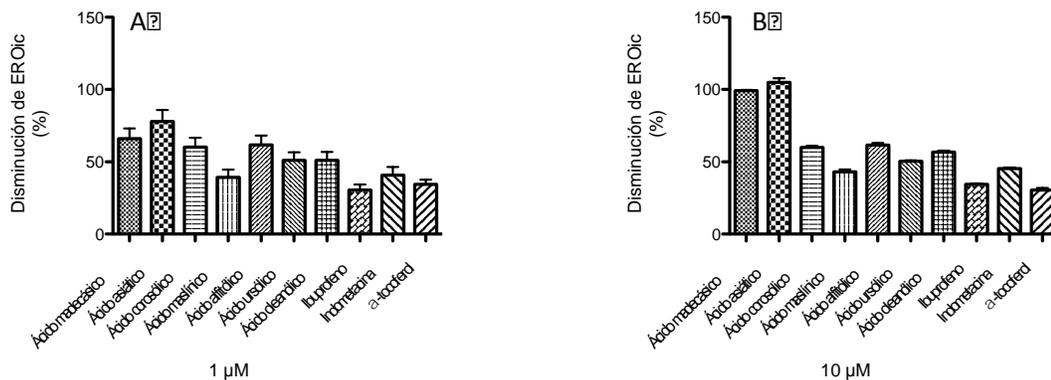


Figura 42: Disminución de EROic inducidas en células β -TC-6 por TNF- α (2 ng/mL) y tratadas con triterpenoides o fármacos de referencia a dos concentraciones por dos horas posteriores a la inducción (n = 6).

Los resultados están expresados como % de disminución de EROic \pm SEM respecto a control (n = 12). ***P < 0,001 vs. control.

Tabla 14: Porcentaje de disminución de EROic inducidas en células β -TC-6 por TNF- α (2 ng/mL) y tratadas con triterpenoides o fármacos de referencia

	% Disminución de EROic \pm SEM	
	1 μ M	10 μ M
Ácido madecásico	65,9 \pm 7,0	99,2 \pm 0,5
Ácido asiático	78,0 \pm 7,9	104,9 \pm 3,0
Ácido corosólico	60,2 \pm 6,4	59,9 \pm 1,1
Ácido maslínico	39,2 \pm 5,3	43,0 \pm 1,7
Ácido alfitólico	61,6 \pm 6,5	61,5 \pm 1,6
Ácido ursólico	51,0 \pm 5,6	50,5 \pm 0,6
Ácido oleanólico	51,1 \pm 5,7	56,7 \pm 1,1
Ibuprofeno	30,4 \pm 4,0	34,4 \pm 0,7
Indometacina	40,7 \pm 5,7	45,4 \pm 0,7
α -tocoferol	34,4 \pm 3,3	30,4 \pm 1,4

La capacidad anti-oxidante de las células β es muy baja debido a la débil expresión de enzimas antioxidantes tales como glutatión peroxidasa y superóxido dismutasa en los islotes pancreáticos, a diferencia de otros tejidos (Tiedge y cols., 1997). Lo anterior está directamente relacionado con la vulnerabilidad de estas células frente al estrés oxidativo generado por EROic. Se han descrito dos rutas de producción de EROic en células pancreáticas, no mitocondrial y mitocondrial. La ruta no mitocondrial está directamente relacionada con el exceso de glucosa disponible y la mitocondrial a la cadena transportadora de electrones (Brownlee, 2001). En este experimento se mantuvieron los niveles bajos de glucosa en las condiciones de cultivo, de modo que el único inductor de EROic fue TNF- α , el cual estimula la generación de ERO mediante las señalizaciones intracelulares descritas por Kim y cols. (2010). Al existir en estas células limitada capacidad anti-oxidante enzimática, es probable que gran parte de la actividad observada para las muestras evaluadas se deba a sus capacidades de regular las rutas de señalización inductoras de inflamación y ERO.

2.2.3. Evaluación de la acumulación de triglicéridos en adipocitos

2.2.3.1. Efecto de las muestras sobre el proceso de diferenciación celular

Tanto SAE como EAE redujeron significativamente la acumulación de triglicéridos en un $40,7 \pm 10,1$ y $68,4 \pm 7,1\%$, respectivamente. No se observó diferencia significativa entre los efectos de ambas muestras. Sin embargo EAE muestra una tendencia a producir un mayor efecto que SAE (Figura 43 A).

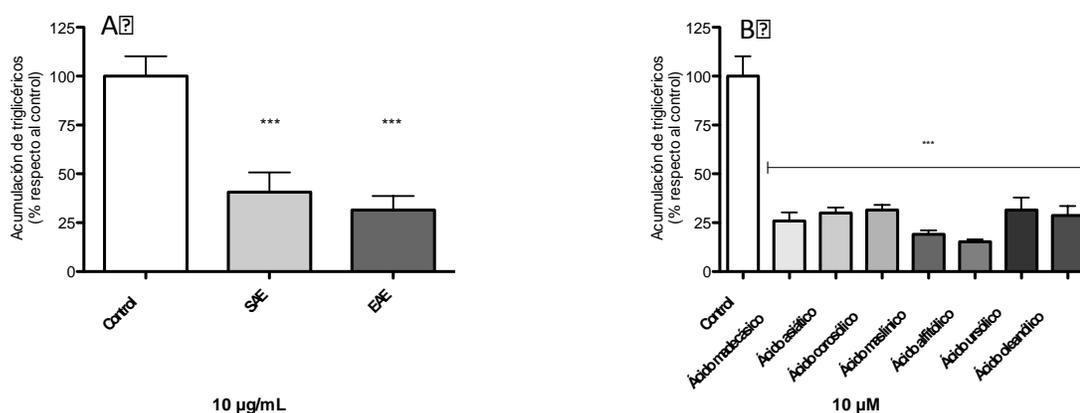


Figura 43: Acumulación de triglicéridos en células 3T3-L1 diferenciadas a adipocitos en presencia de EAE y SAE a una concentración de 10 µg/mL (A) y en presencia de triterpenoides pentacíclicos a una concentración de 10 µM (B).

Los resultados están expresados como porcentajes de acumulación de triglicéridos \pm SD respecto al control (n = 4). *** P < 0,001.

Los triterpenoides ensayados, presentes en las hojas de *U. molinae*, mostraron un importante efecto de disminución de la acumulación de triglicéridos durante el proceso de diferenciación celular (Figura 43 B).

Estos resultados confirman los obtenidos por Zong y Zhao (2007) para el ácido corosólico, quienes concluyeron que este triterpenoide promueve la absorción de glucosa, suprime la diferenciación y regula negativamente en adipocitos 3T3-L1 la expresión de PPAR- γ y C/EBP- α . Recientemente Sung y cols. (2010) demostraron que

el ácido oleanólico posee similar efecto al ácido corosólico sobre la diferenciación de adipocitos, demostrados por Zong y Zhao (2007).

De acuerdo al análisis químico realizado a los EAE y SAE se obtiene que la concentración de 10 µg/mL evaluada en este ensayo contiene las concentraciones de los compuestos señaladas en la Tabla 15. El intervalo de concentraciones en el que se encuentran los triterpenoides explicaría en gran parte el efecto tanto de EAE como de SAE, pudiéndose proponer un efecto aditivo entre los efectos de cada compuesto.

Tabla 15: Concentración de triterpenoides en EAE y SAE 10 µg/mL

	Concentración	
	EAE 10 µg/mL	SAE 10 µg/mL
	µM	µM
Ácido madecásico	0,2	1,7
Ácido asiático	1,7	4,2
Ácido alfitólico	2,0	0,1
Ácido corosólico	5,8	1,0
Ácido maslínico	1,6	3,1
Ácido betulínico	0,4	0,0
Ácidos oleanólico y ursólico	4,6	0,2

Sin embargo, también se ha demostrado que los flavonoides canferol y quercetina mejoran la captura de glucosa en adipocitos sin inducir adipogénesis en células 3T3-L1, actuando como agonistas parciales del PPAR-γ (Fang y cols., 2008) y existen datos que demuestran el efecto anti-adipogénico de flavonoides (Harmon y Harp, 2001) también en el proceso de diferenciación celular. Estos antecedentes no permiten descartar el aporte de los compuestos fenólicos, también presentes tanto en EAE como en SAE, a su efecto sobre la diferenciación celular de adipocitos.

2.2.3.2. Efecto de las muestras sobre la acumulación de triglicéridos en adipocitos maduros estimulados con TNF- α

El TNF- α , actúa sobre el metabolismo de lípidos en adipocitos inhibiendo la lipogénesis y la absorción de ácidos grasos libres, además de estimular su liberación vía lipólisis (Cawthorn y Sethi, 2008). Este efecto se puede apreciar en la Figura 44 donde en el grupo control positivo se observó una acumulación de triglicéridos equivalente a un $87,3 \pm 2,6\%$ comparado al grupo control negativo (100%) de adipocitos maduros no estimulados por 24 horas con TNF- α (2 ng/mL). El proceso de lipólisis inducido por TNF- α es mediado por las proteínas JNK, ERK1/2 y por NF- κ B, siendo inhibido por supresores de este último como las tiazolidindionas (Souza y cols., 1998).

Este experimento evaluó posibles efectos de las muestras sobre la metabolización de lípidos en adipocitos maduros y en presencia de TNF- α , puesto que sustancias capaces de inhibir la activación de NF- κ B podrían suprimir el efecto anti-adipogénico y lipolítico que ejerce el TNF- α sobre los adipocitos y los efectos supresores de distintos triterpenoides sobre NF- κ B son ampliamente conocidos (Won y cols., 2010b; Yun y cols., 2008; Zeng y cols., 2012).

Se obtuvo que las células tratadas con EAE y SAE a una concentración de 1 μ g/mL y los triterpenoides evaluados a una concentración de 10 μ M no alteraron el efecto lipolítico del TNF- α , lo contrario sucedió al aumentar 10 veces la concentración tanto de los extractos como de la mayoría de los triterpenoides (Figura 44 A).

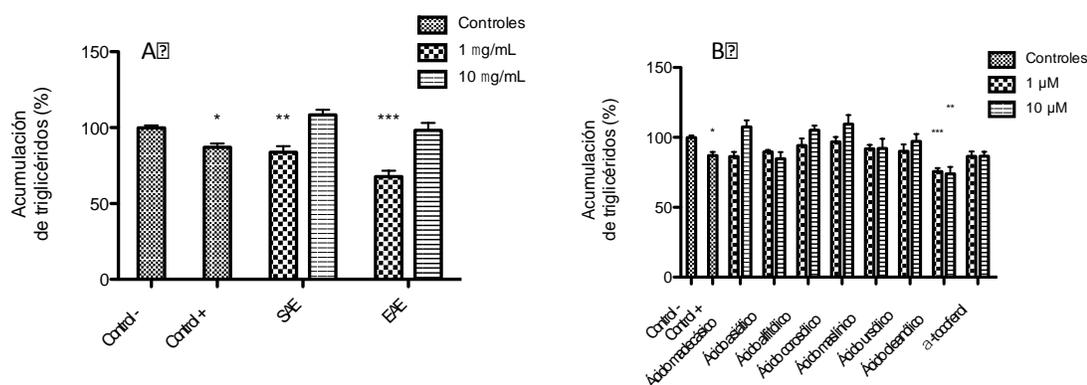


Figura 44: Acumulación de triglicéridos en adipocitos maduros expuestos a TNF- α (2 ng/mL) y tratados con SAE y EAE (A) y con triterpenoides pentacíclicos (B) por 24 horas

Los resultados están expresados en porcentajes de acumulación de triglicéridos \pm SEM respecto al control negativo (n = 4). *0,01 < P < 0,05; **0,001 < P < 0,01; ***P < 0,001

Tabla 16: Porcentaje de acumulación de triglicéridos en adipocitos maduros expuestos a TNF- α (2 ng/mL) y tratados con triterpenoides pentacíclicos por 24 horas.

	% Acumulación de triglicéridos \pm SEM	
	1 μ M	10 μ M
Ácido madecásico	86,3 \pm 3,3	107,6 \pm 4,6
Ácido asiático	89,6 \pm 1,4	84,9 \pm 4,6
Ácido alfitólico	94,2 \pm 5,2	105,1 \pm 3,3
Ácido corosólico	96,8 \pm 3,5	109,6 \pm 6,3
Ácido maslínico	91,9 \pm 2,9	92,1 \pm 7,0
Ácido ursólico	90,0 \pm 5,0	97,1 \pm 5,2
Ácido oleanólico	75,6 \pm 2,5***	73,9 \pm 5,1**
α -tocoferol	86,5 \pm 3,5	86,6 \pm 3,1

Los resultados están expresados en porcentajes de acumulación de triglicéridos \pm SEM respecto al control negativo (n = 4). *0,01 < P < 0,05; **0,001 < P < 0,01; ***P < 0,001

Es importante mencionar que a diferencia del ácido madecásico, el ácido asiático no inhibe la actividad lipolítica del TNF- α a la mayor concentración. Esto es sustentable al comparar los estudios de Yun y cols. (2008) con los de Won y cols. (2010a) donde el ácido madecásico demostró ser un inhibidor de la activación de NF- κ B más potente que el ácido asiático. Es evidente que la presencia del grupo hidroxilo en C-6 potenciaría la actividad inhibitoria de NF- κ B (Figura 45).

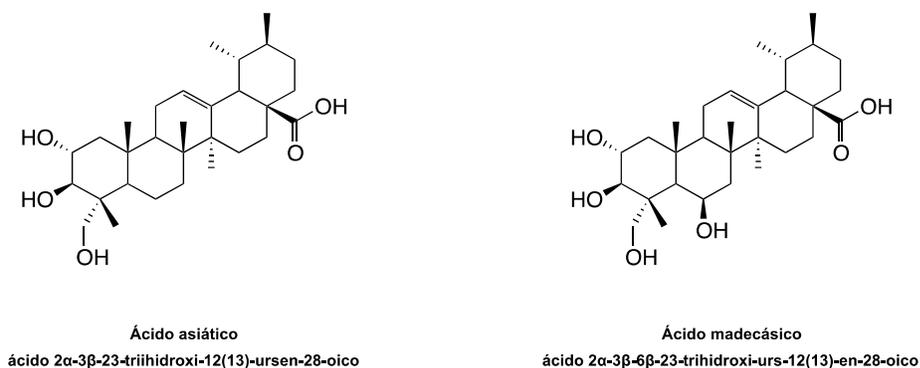


Figura 45: Ácidos asiático y madecásico

Del mismo modo, Takada y cols. (2010) recientemente demostraron que tanto el ácido ursólico como el oleanólico inhiben la activación de NF- κ B de manera dosis-dependiente. Los autores observaron que este último actúa con la mitad de la potencia de su isómero estructural y sostienen que esta diferencia se debe a las diferencias estructurales y conformacionales que existen entre ellos. La actividad inhibitoria de los triterpenos aquí evaluados sobre el efecto del NF- κ B se hace evidente al observar que el único compuesto que no inhibió significativamente el efecto lipolítico inducido por TNF- α fue el ácido oleanólico y se debería a su menor potencia inhibitoria de la activación de NF- κ B. Además, un estudio reciente en adipocitos de cultivo primario de rata tratados con este triterpenoide demostró que el ácido ursólico estimula de manera dosis-dependiente (25 – 100 μ M) la lipólisis en adipocitos por la vía de la proteína quinasa A (PKA) dependiente de AMP cíclico (Li y cols., 2010).

Los resultados obtenidos muestran que gran parte de los triterpenoides pentacíclicos descritos para *U. molinae* a concentraciones inferiores a 10 μ M, inhibirían la lipólisis inducida por TNF- α debido a sus efectos inhibitorios sobre la activación de NF- κ B.

2.2.4. Evaluación del efecto de las muestras sobre la liberación de IL-6 desde adipocitos estimulados con TNF- α

Los adipocitos del tejido adiposo blanco al estar expuestos al TNF- α liberan citoquinas pro-inflamatorias entre las cuales destaca la IL-6 (Xu y cols., 2003). De este modo, para estudiar los posibles efectos de los extractos de *U. molinae* y sus triterpenoides en este proceso inflamatorio del síndrome metabólico, fueron evaluadas dos concentraciones de SAE (1 y 10 $\mu\text{g/mL}$) en un modelo celular de adipocitos maduros expuestos a TNF- α observándose que ambas concentraciones redujeron de manera equivalente ($33,4 \pm 3,4$ y $32,3 \pm 3,0\%$, respectivamente) la cantidad de IL-6 liberada.

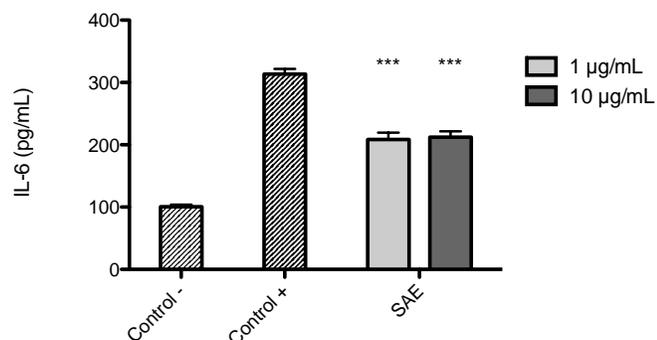


Figura 46: Cantidad de IL-6 liberada por adipocitos maduros estimulados con TNF- α en presencia de SAE

Los resultados están expresados en pg/mL de IL-6 \pm SEM (n = 5). * $0,01 < P < 0,05$; ** $0,001 < P < 0,01$; *** $P < 0,001$.

De los triterpenoides evaluados sólo los ácidos madecásico 1 y 10 μM , corosólico 1 μM y alfitólico 10 μM disminuyeron significativamente la liberación de IL-6 frente al control positivo (Figura 47 y Tabla 17). La Tabla 18 muestra los efectos obtenidos con estos compuestos.

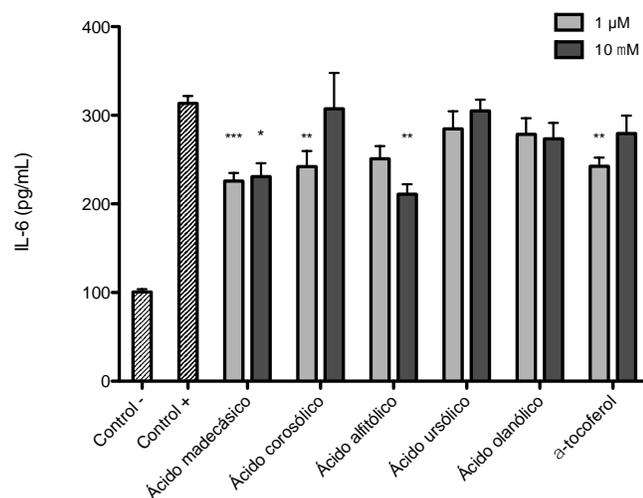


Figura 47: Cantidad de IL-6 liberada por adipocitos maduros estimulados con TNF- α en presencia de triterpenoides pentacíclicos y fármaco de referencia (α -tocoferol).

Los resultados están expresados en pg/mL de IL-6 \pm SEM (n = 5). *0,01 < P < 0,05; **0,001 < P < 0,01; ***P < 0,001.

Tabla 17: Cantidad de IL-6 liberada por adipocitos maduros estimulados con TNF- α en presencia de triterpenoides pentacíclicos y fármaco de referencia

	IL-6 \pm SEM (pg/mL)	
	1 μ M	10 μ M
Control -	100,6 \pm 3,3	100,6 \pm 3,3
Control +	313,4 \pm 8,3	313,4 \pm 8,3
Ácido madecásico	225,8 \pm 9,1***	231,0 \pm 14,9*
Ácido corosólico	242,2 \pm 17,6**	307,4 \pm 40,3
Ácido alfitólico	251,0 \pm 14,1*	211,0 \pm 11,3**
Ácido ursólico	284,6 \pm 20,0	305,0 \pm 12,8
Ácido oleanólico	278,6 \pm 18,3	273,4 \pm 18,0
α -tocoferol	242,6 \pm 9,7**	279,4 \pm 20,4

Los resultados están expresados en pg/mL de IL-6 \pm SEM (n = 5). *0,01 < P < 0,05; **0,001 < P < 0,01; ***P < 0,001.

Tabla 18: Efecto inhibitor de la liberación de IL-6 desde adipocitos estimulados con TNF- α de los ácidos madecásico, corosólico y alfitólico

	% Efecto \pm SEM	
	1 μ M	10 μ M
Ácido madecásico	28,0 \pm 2,9	26,3 \pm 4,8
Ácido corosólico	22,7 \pm 5,6	n.e.
Ácido alfitólico	n.e.	32,7 \pm 3,6

n.e. no se observó efecto

Estos resultados se consideraron preliminares, ya que se deberían evaluar al menos dos dosis adicionales para obtener conclusiones más sólidas respecto de este ensayo.

2.3. Evaluación del efecto de las muestras sobre la actividad de las enzimas catalasa y xantina oxidasa

Existen antecedentes en la literatura que demuestran que los triterpenoides poseen actividades moduladoras sobre sitios alostéricos enzimáticos (Wen y cols., 2008). Se evaluó en este ensayo una posible activación alostérica sobre la catalasa de ratón, determinando si la modulación de esta enzima contribuiría a la actividad anti-oxidante de las muestras ensayadas en los modelos celulares.

No se observaron cambios estadísticamente significativos sobre la actividad enzimática de la catalasa frente a SAE y EAE a 1 y 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$, como tampoco frente a los triterpenoides evaluados a 1 y 10 μM (ácidos madecásico, asiático, alfitólico, corosólico, ursólico y maslínico) (Figura 48). De este modo, la actividad reductora del nivel de EROic descrita anteriormente no tendría relación con la actividad catalítica de esta enzima.

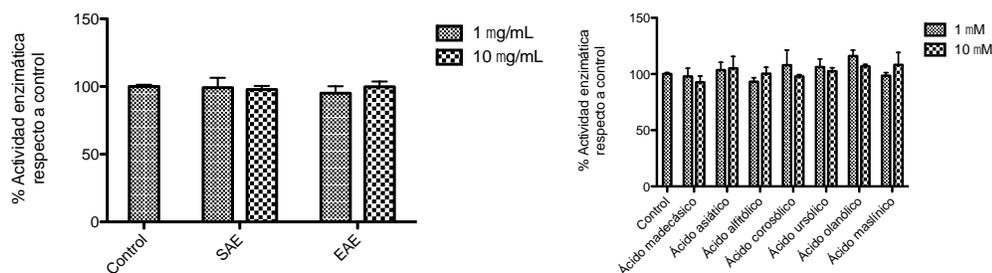


Figura 48: Efecto de SAE, EAE y triterpenoides sobre la actividad enzimática de la catalasa

Por otro lado, la xantina oxidasa (XO) se encuentra en el citosol y se ha demostrado que junto con la mitocondria es una de las mayores fuentes de especies reactivas de oxígeno en ratones diabéticos y que su inhibición reduce el estrés oxidativo y mejora las alteraciones mitocondriales (Bravard y cols., 2011). Por esta razón se decidió evaluar si existía efecto inhibitorio sobre esta enzima a las mismas concentraciones de EAE y SAE empleadas en los ensayos celulares y a las mismas

concentraciones de los ácidos asiático, alifólico, corosólico, ursólico, oleanólico y maslínico.

Se observó que todos los triterpenoides evaluados a la concentración 10 μM inhibieron la actividad de la XO (Figura 49 B y Tabla 19). El análisis estadístico de comparaciones múltiples de Tukey indicó que el efecto inhibitorio sobre la actividad enzimática fue estadísticamente equivalente ($P > 0,05$) entre los compuestos.

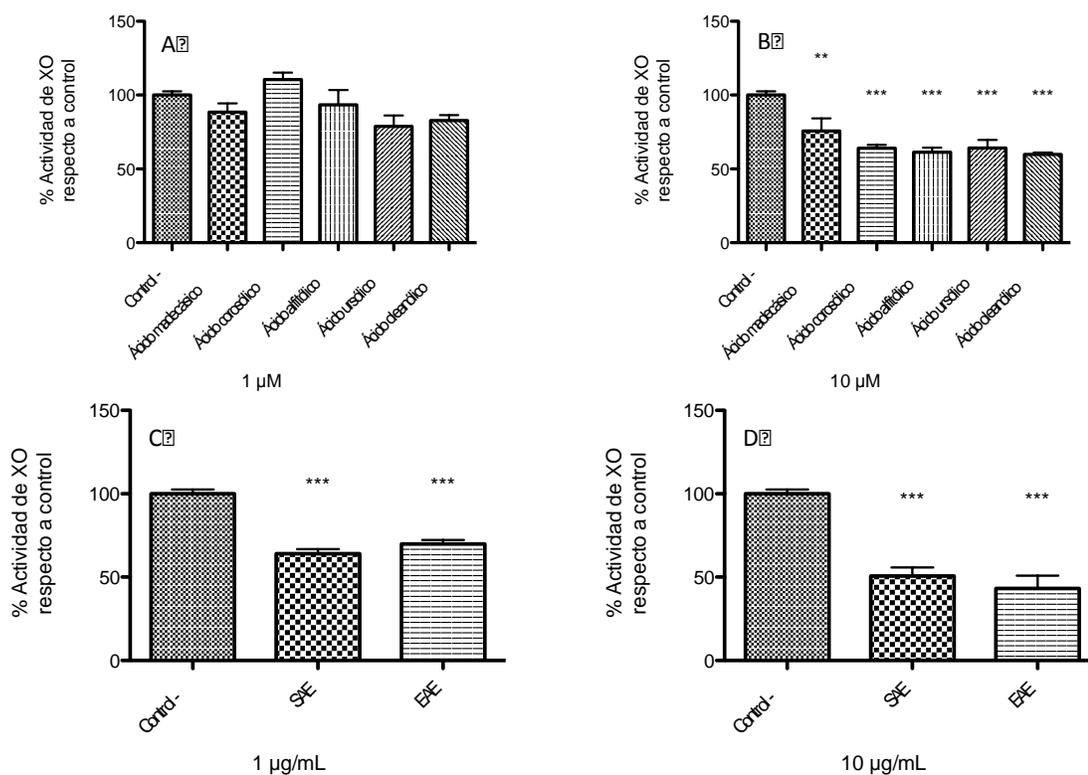


Figura 49: % Actividad de la xantina oxidasa (XO) frente a triterpenoides pentacíclicos a concentraciones 1 μM (A) y 10 μM (B) y frente a SAE y EAE a concentraciones de 1 $\mu\text{g/mL}$ (C) y 10 $\mu\text{g/mL}$ (D).

Los resultados están expresados como el promedio de 5 réplicas \pm SEM. **0,001 < P < 0,01; *** P < 0,001.

Tabla 19: Efecto inhibitorio de triterpenoides pentacíclicos sobre la xantina oxidasa (XO)

	% Inhibición de XO	
	10 μ M	
Ácido madecásico	24,3	\pm 8,6**
Ácido corosólico	36,0	\pm 2,2***
Ácido alfitólico	38,6	\pm 3,0***
Ácido ursólico	35,9	\pm 5,4***
Ácido oleanólico	40,2	\pm 1,3***

Los resultados están expresados como el promedio de 5 réplicas \pm SEM. **0,001 < P < 0,01; ***P < 0,001.

Antecedentes obtenidos de la literatura indican que la actividad de otros triterpenoides pentacíclicos presentes tanto en SAE como en el EAE es similar a la obtenida para los aquí evaluados (Yin y Chan, 2007).

El EAE y SAE inhibieron la enzima de manera dependiente de la concentración como se observa en la Tabla 20.

Tabla 20: Efecto inhibitorio del EAE y SAE sobre xantina oxidasa (XO)

	% Inhibición XO	
	1 μ g/mL	10 μ g/mL
SAE	35,9 \pm 2,7	49,3 \pm 5,1
EAE	30,2 \pm 2,5	56,9 \pm 7,9

Estas actividades no son completamente explicables por la presencia de los triterpenoides si se considera el contenido de éstos en SAE y EAE (Tabla 21). Las conocidas actividades inhibitorias de los flavonoides sobre esta enzima (Nagao y cols., 1999) aportarían de manera importante a la actividad global de SAE y EAE.

Tabla 21: Concentraciones molares de los triterpenoides pentacíclicos presentes en SAE y EAE 1 y 10 µg/mL

	Concentración de triterpenoides (µM)			
	1 µg/mL		10 µg/mL	
	EAE	SAE	EAE	SAE
Ácido madecásico	0,0	0,2	0,2	1,7
Ácido asiático	0,2	0,4	1,7	4,2
Ácido alfitólico	0,2	0,0	2,0	0,1
Ácido corosólico	0,6	0,1	5,8	1,0
Ácido maslínico	0,2	0,3	1,6	3,1
Ácido betulínico	0,0	0,0	0,4	0,0
Ácido oleanólico	0,2	0,0	1,4	0,1
Ácido ursólico	0,4	0,0	3,2	0,1

2.4. Evaluación del efecto de los extractos de *U. molinae* sobre la actividad de la glicógeno fosforilasa a (GPa)

La actividad inhibitoria de todos los triterpenoides descritos para esta especie ha sido evaluada previamente frente a la GPa (Hao y cols., 2009; Wen y cols., 2008). Fueron evaluados los extractos EAE, EET y SAE, observándose para éstos a una concentración de 60 µg/mL actividades inhibitorias de $45,9 \pm 4,3$, $92,2 \pm 1,1$ y $91,6 \pm 1,2\%$, respectivamente.

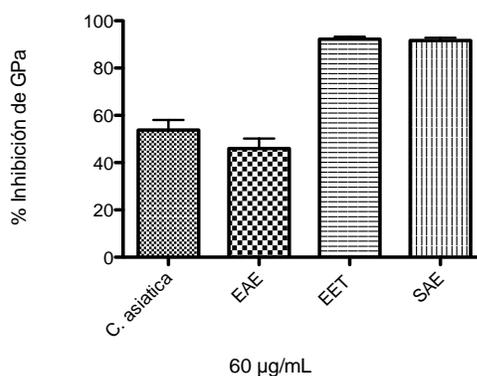


Figura 50: Efecto inhibitorio de extractos de las hojas de *U. molinae* y un extracto de referencia de *C. asiatica* sobre la glicógeno fosforilasa a (GPa)

La cuantificación de los triterpenoides de los extractos evaluados en este ensayo se muestra en la Tabla 22.

Tabla 22: Valores de CI_{50} frente a GPa de los triterpenoides presentes en las hojas de *U. molinae* y las concentraciones molares de los triterpenoides pentacíclicos presentes en EAE, EET y SAE a 60 $\mu\text{g/mL}$.

	CI_{50} GPa (μM)	Concentración en 60 $\mu\text{g/mL}$			
		EAE	EET	SAE	Ext. <i>C. asiatica</i>
Ácido ursólico	9*	19,3 μM	0,3 μM	0,8 μM	
Ácido oleanólico	14*	8,3 μM	0,1 μM	0,3 μM	
Ácido asiático	17*	9,9 μM	9,0 μM	25,3 μM	36,8 μM
Ácido corosólico	20*	35,0 μM	2,0 μM	6,2 μM	
Ácido alfitólico	21**	11,9 μM	0,3 μM	0,5 μM	
Ácido maslínico	28*	9,5 μM	5,1 μM	18,5 μM	
Ácido betulínico	43*	2,4 μM	0,0 μM	0,0 μM	
Ácido madecásico	s.a.*	1,3 μM	4,3 μM	10,0 μM	35,7 μM

CI_{50} : Concentración inhibitoria 50; *Wen y cols. (2008); **Hao y cols. (2009); s.a.: sin actividad

El extracto estandarizado de referencia de *C. asiatica* utilizado como referencia inhibió la enzima en un $53,8 \pm 4,3\%$, considerándose responsable de este efecto el ácido asiático que está presente en una concentración 36,8 μM . Wen y cols. (2008) demostraron que tanto el ácido madecásico como el asiaticósido no poseen actividad inhibitoria sobre la GPa, por lo que al observar la concentración del triterpenoide activo de este extracto es posible proponer que tanto el ácido madecásico como los heterósidos podrían competir por el sitio alostérico de la enzima, atenuando el efecto del ácido asiático en la mezcla.

Por otro lado se ha demostrado que un número importante de flavonoides inhibe la GPa, entre ellos la quercetina con una CI_{50} 4,8 μM (Jakobs y cols., 2006). Por lo anterior se puede considerar que estos compuestos, presentes en EET son los principales responsables de su efecto.

Puesto que el efecto del EAE fue menos al que presentan cada uno de los triterpenoides en forma aislada frente a esta enzima, se pudo concluir que no hubo ni potenciación ni sumación. Estos antecedentes servirán de base para futuros estudios farmacodinámicos frente a esta enzima.

VI. PROYECCIONES

En los últimos años se ha observado un creciente interés en la búsqueda de moléculas bioactivas de fuentes naturales para desarrollar nuevas generaciones de productos naturales de importancia terapéutica en la prevención y el tratamiento de la diabetes tipo 2 y sus diversas complicaciones (Naik y Kokil, 2013; Yin, 2012), por esta razón los resultados farmacológicos expuestos en esta tesis permiten abrir nuevas perspectivas en el estudio farmacológico de esta especie, promoviendo un estudio más profundo de los mecanismos de acción.

Será necesario conocer también los parámetros farmacocinéticos de los extractos de murtila, debido a que éstos corresponden a una asociación de componentes bioactivos. Existen antecedentes sobre la biodisponibilidad y distribución tanto de triterpenoides como de flavonoides, conociéndose el comportamiento de algunos de estos metabolitos secundarios tanto en humanos como en animales de experimentación al ser administrados como monodroga (Crozier y cols., 2010; Rush y cols., 1993; Yin y cols., 2012).

En datos no mostrados se pudo observar una importante variación en la composición de ácido asiático en distintos genotipos de la especie *Ugni molinae* y en ejemplares que crecen en distintas latitudes, dando esto cuenta de la influencia tanto del genotipo como de las condiciones edafoclimáticas en la biosíntesis tanto de triterpenoides pentacíclicos como de compuestos fenólicos. El estudio mencionado en dichos genotipos generó una nueva línea de investigación del laboratorio de productos naturales en esta especie, la que establecerá las diferencias en la composición química y en los efectos farmacológicos entre los distintos genotipos. De esta forma se desarrollarán extractos estandarizados a partir del genotipo que presenta la composición química de mayor eficacia farmacológica.

VII. CONCLUSIONES

En esta tesis se confirmó la hipótesis al demostrar que los extractos obtenidos desde las hojas de *Ugni molinae* Turcz. así como sus metabolitos secundarios, exhiben actividades inhibitorias de la glicógeno fosforilasa a, moduladoras de la adipogénesis, anti-inflamatorias y antioxidantes, obteniendo las siguientes conclusiones:

Estudios químicos

- Los extractos seriados de acetato de etilo (EAE) y etanol (EET) de las hojas de *U. molinae* son fuente de los ácidos, asiático, alfitólico, corosólico, betulínico, oleanólico, ursólico, madecásico y maslínico. Siendo estos dos últimos identificados por primera vez en esta especie.
- El EAE contiene los ácidos madecásico, asiático, alfitólico, corosólico, maslínico, betulínico, oleanólico y ursólico siendo mayoritarios los ácidos corosólico, ursólico y oleanólico.
- El EET es un extracto rico en compuestos fenólicos y es posible obtener desde él por aparato de Soxhlet una fracción enriquecida en triterpenoides (SAE). Esta extracción permitió, concentrar alrededor de 3 veces la cantidad de los ácidos madecásico, asiático, corosólico y maslínico.

Actividad anti-inflamatoria

- SAE demostró tener efecto anti-inflamatorio tópico significativo de un $43,3 \pm 4,2\%$ a una dosis de 1 mg/oreja en el modelo de edema de oreja de ratón inducido por TPA. Este efecto es atribuible en parte a la presencia del ácido madecásico (DE_{50} de 0,11 $\mu\text{mol/oreja}$) y a los ácidos asiático, corosólico y maslínico, también presentes en el SAE a los cuales se les ha demostrado previamente su actividad anti-inflamatoria tópica. Es posible concluir también que los compuestos fenólicos presentes en SAE contribuyen a su efecto anti-inflamatorio tópico.

- La presencia de un grupo hidroxilo en C-6 en el ácido madecásico incrementa la potencia anti-inflamatoria tópica demostrada para los derivados del ursano.
- Preliminarmente, SAE a concentraciones de 1 y 10 $\mu\text{g/mL}$ y los ácidos madecásico 1 y 10 μM , corosólico 1 μM y alfitólico 10 μM redujeron significativamente la cantidad de IL-6 liberada desde adipocitos maduros expuestos a TNF- α .

Actividad anti-oxidante

- Tanto EAE como SAE redujeron significativamente el nivel de especies reactivas de oxígeno intracelulares (EROic) inducidas por TNF- α en macrófagos y células β pancreáticas, debiéndose este efecto tanto a los triterpenoides pentacíclicos como a los compuestos fenólicos presentes.
- Los ácidos madecásico, asiático, corosólico, maslínico, alfitólico, ursólico y oleanólico a concentraciones de 1 y 10 μM fueron capaces de disminuir el nivel de EROic inducidas por TNF- α tanto en macrófagos como en células β pancreáticas, siendo el efecto más potente en estas últimas células. El efecto antioxidante intracelular se debería principalmente a las capacidades que tienen estos compuestos de regular las rutas de señalización inductoras de inflamación y de ERO.
- Se observó una disminución del efecto atenuador del nivel de EROic mostrado por los derivados del ursano (ácidos madecásico, asiático, corosólico y ursólico) y el derivado del lupano (ácido alfitólico). Esta disminución de efecto se podría deber al efecto inhibitor del NF- κB demostrado para estos compuestos, debido a que la señalización de este factor nuclear induce la expresión de agentes antioxidantes intracelulares como la MnSOD y FHC.

Actividad moduladora de la adipogénesis

- Tanto SAE como EAE a una concentración de 10 $\mu\text{g/mL}$ inhiben el proceso de diferenciación de adipocitos debido en gran parte a los triterpenoides presentes.

Éstos, a una concentración de 10 μM , mostraron un importante efecto inhibitorio.

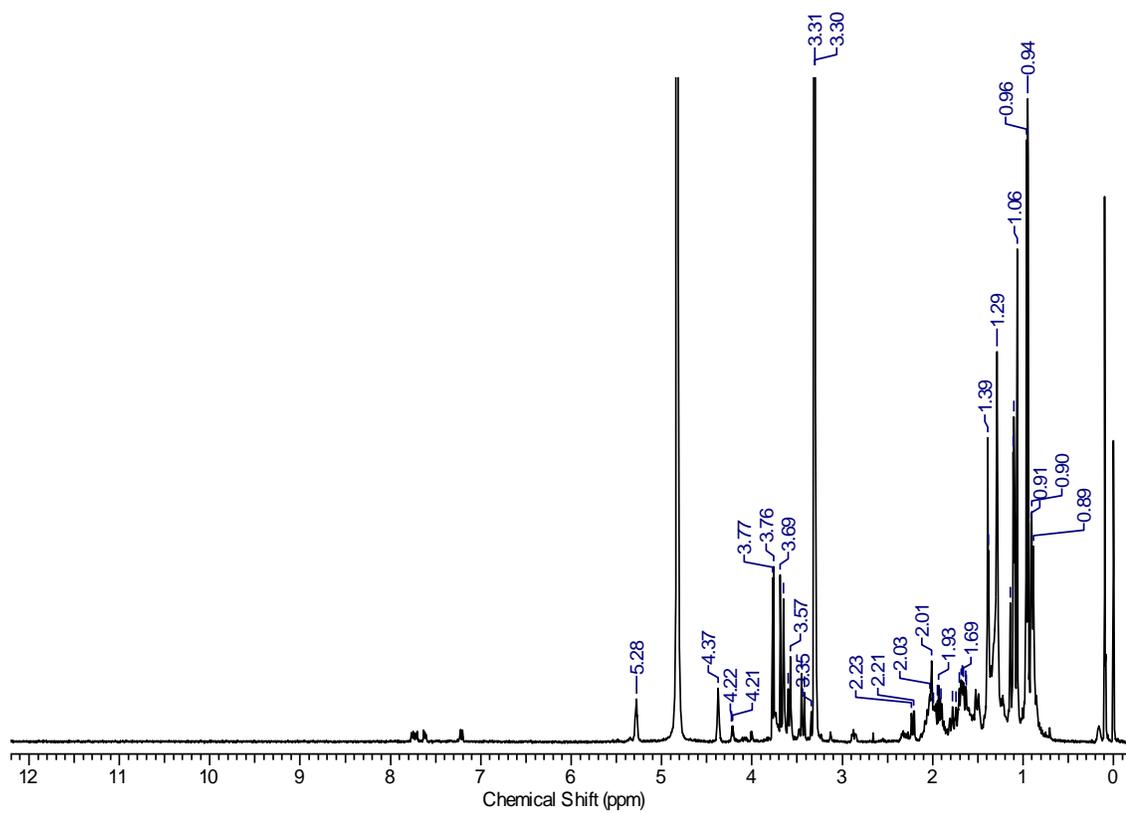
- SAE (1 $\mu\text{g/mL}$) y sus triterpenoides pentacíclicos (1 μM) no reducen la acumulación de triglicéridos en adipocitos maduros expuestos a TNF- α . Se observó un leve aumento en la acumulación de triglicéridos al exponer a los adipocitos a una concentración diez veces mayor a las iniciales, este efecto se podría deber a la inhibición sobre la cascada de señalización de TNF- α el cuál presenta actividad lipolítica en adipocitos.

Actividad inhibitoria de la glicógeno fosforilasa a

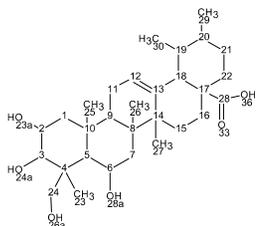
- EET, EAE y SAE a una concentración de 60 $\mu\text{g/mL}$ inhiben la enzima glicógeno fosforilasa a, observándose actividades inhibitorias de $45,9 \pm 4,3$, $92,2 \pm 1,1$ y $91,6 \pm 1,2\%$, respectivamente. Tanto triterpenoides como flavonoides estarían involucrados en este efecto.

ANEXOS

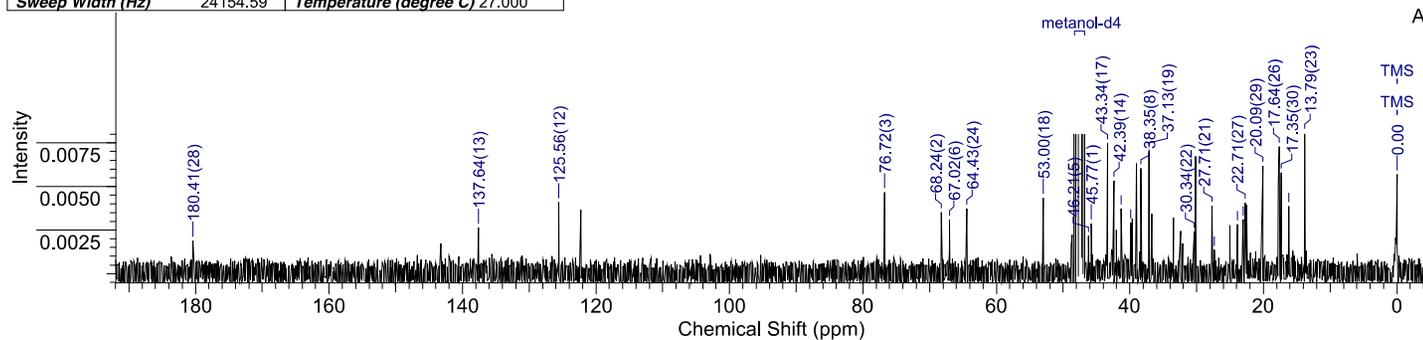
Anexo 1: Espectros de RMN del compuesto U7 (ácido madecásico)

A1.1. ^1H -RMN

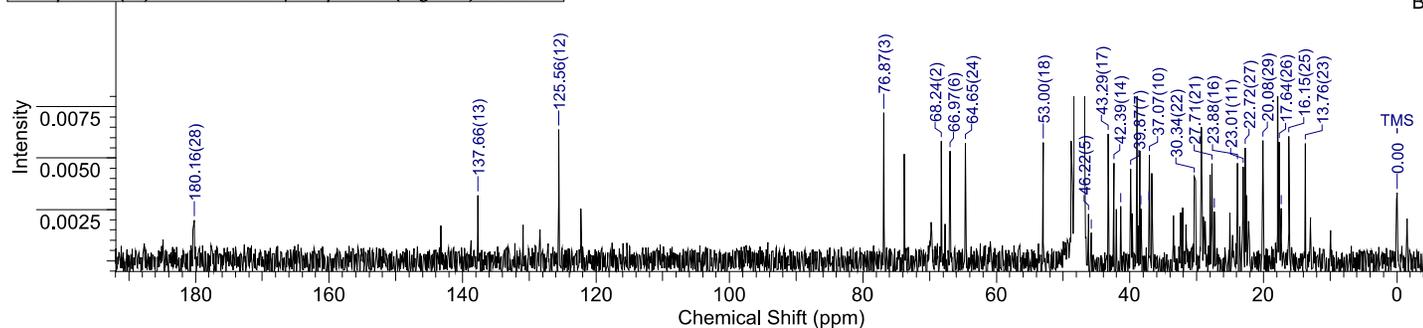
A1.2. ¹³C-RMN de ácido madecásico patrón (A) y muestra del compuesto U7 (B) en metanol-d4



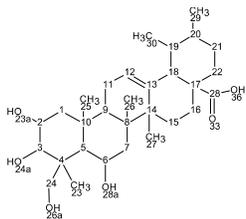
Acquisition Time (sec)	0.6783	Date	04 Jan 2013 13:20:00	Frequency (MHz)	100.62	Nucleus	13C
Original Points Count	16384	Points Count	16384	Pulse Sequence	zgpg30	Solvent	METHANOL-D4
Sweep Width (Hz)	24154.59	Temperature (degree C)	27.000				



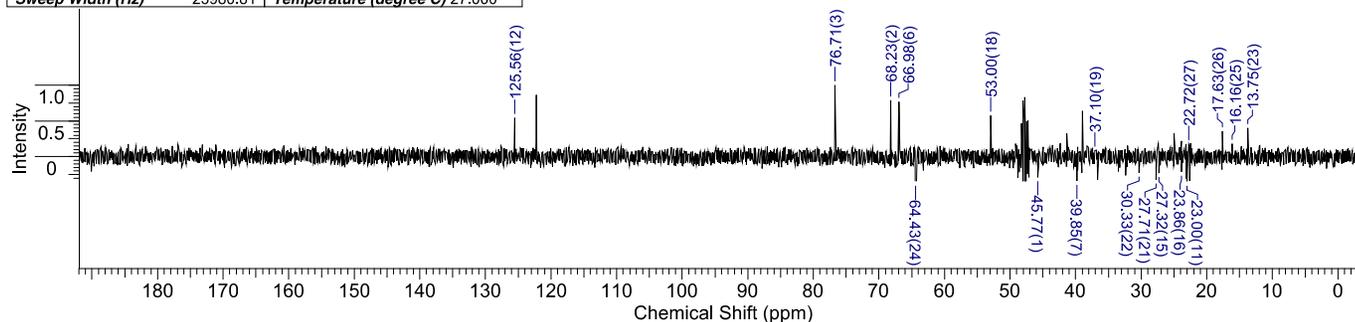
Acquisition Time (sec)	0.6783	Date	05 Dec 2010 13:21:02	Frequency (MHz)	100.61	Nucleus	13C
Original Points Count	16384	Points Count	32768	Pulse Sequence	zgpg30	Solvent	METHANOL-D4
Sweep Width (Hz)	24154.59	Temperature (degree C)	27.000				



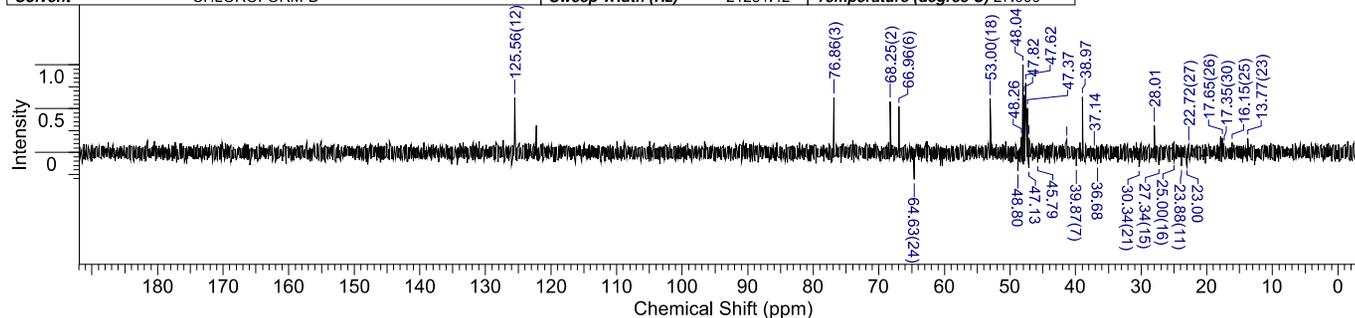
A1.3. DEPT-135 de ácido madecásico patrón (A) y muestra del compuesto U7 (B) en metanol-d4



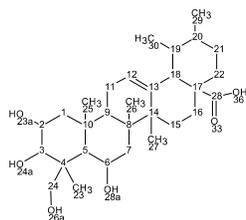
Acquisition Time (sec)	0.6832	Date	04 Jan 2013 01:10:24	Frequency (MHz)	100.62	Nucleus	13C
Number of Transients	12841	Original Points Count	16384	Points Count	16384	Pulse Sequence	dept135
Sweep Width (Hz)	23980.81	Temperature (degree C)	27.000	Solvent	MeOD		



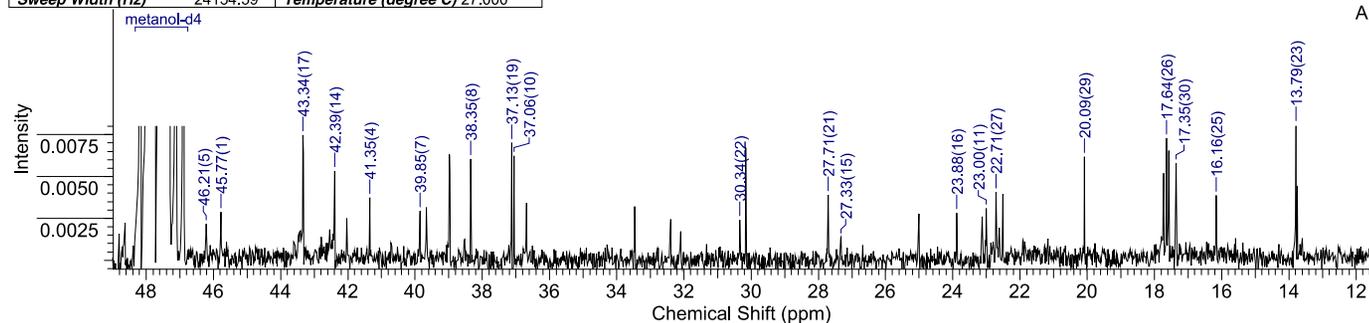
Acquisition Time (sec)	0.7717	Date	04 Dec 2010 17:16:48	Frequency (MHz)	100.62	Nucleus	13C
Number of Transients	15000	Original Points Count	16384	Points Count	16384	Pulse Sequence	dept135
Solvent	CHLOROFORM-D	Sweep Width (Hz)	21231.42	Temperature (degree C)	27.000		



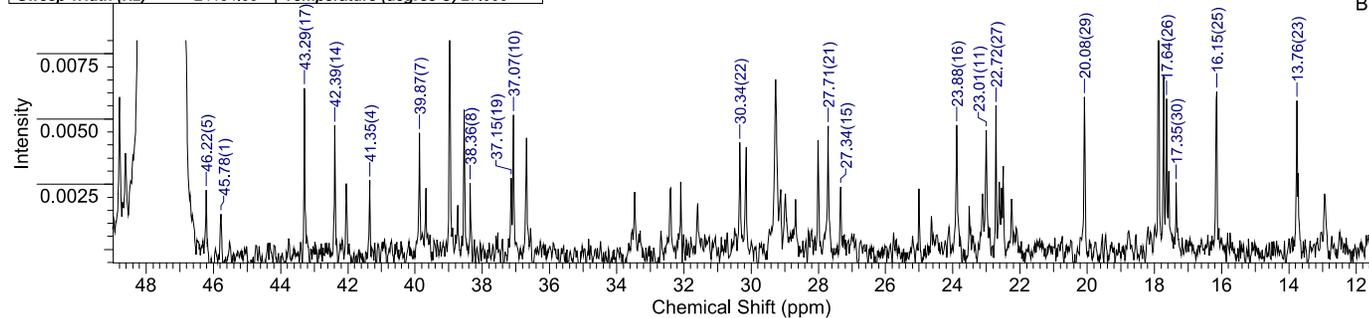
A1.4. ¹³C-RMN (ampliado) de ácido madecásico patrón (A) y muestra del compuesto U7 (B) en metanol-d4



Acquisition Time (sec)	0.6783	Date	04 Jan 2013 13:20:00	Frequency (MHz)	100.62	Nucleus	13C
Original Points Count	16384	Points Count	16384	Pulse Sequence	zgpg30	Solvent	METHANOL-D4
Sweep Width (Hz)	24154.59	Temperature (degree C)	27.000				

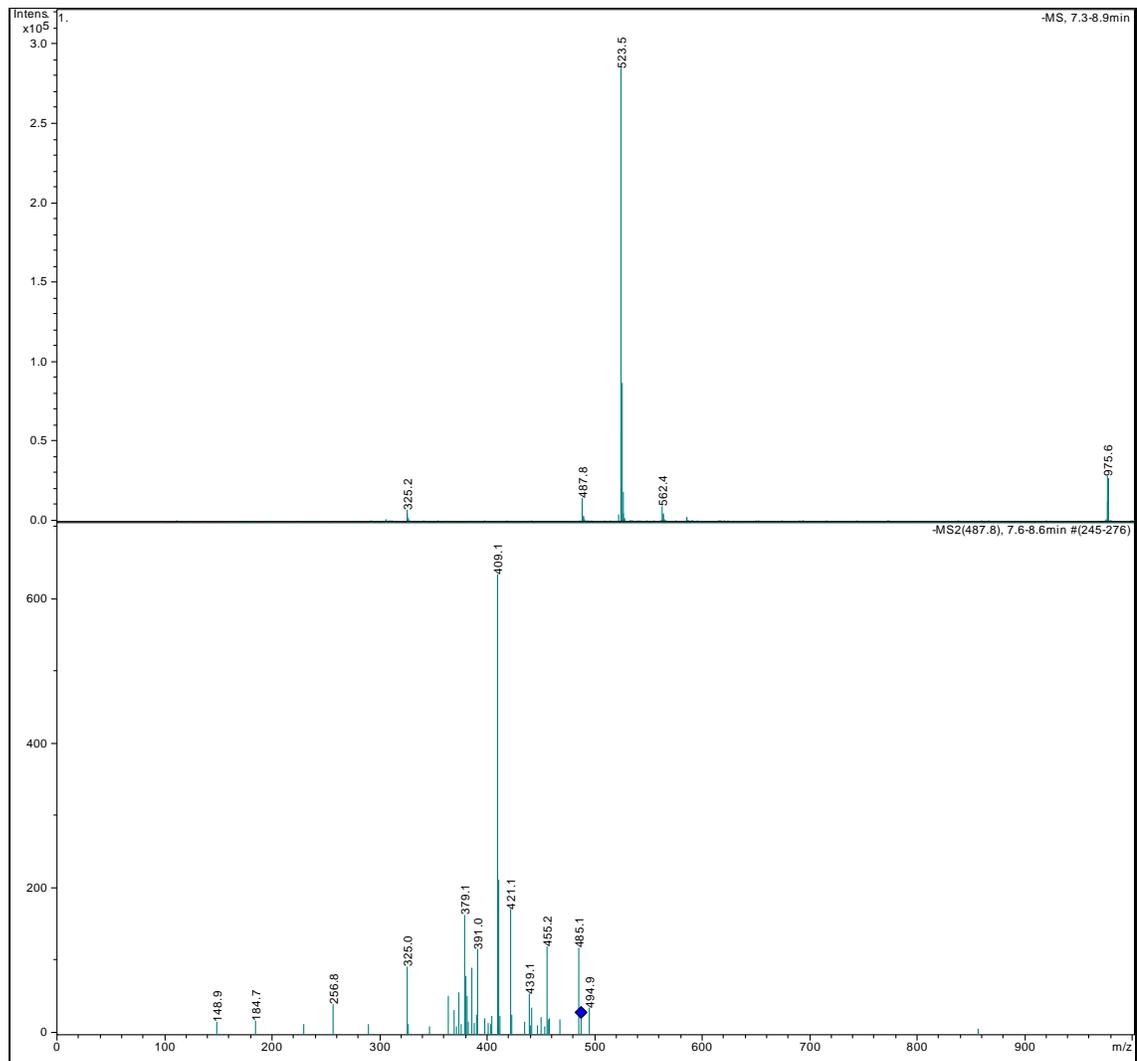


Acquisition Time (sec)	0.6783	Date	05 Dec 2010 13:21:02	Frequency (MHz)	100.61	Nucleus	13C
Original Points Count	16384	Points Count	32768	Pulse Sequence	zgpg30	Solvent	METHANOL-D4
Sweep Width (Hz)	24154.59	Temperature (degree C)	27.000				



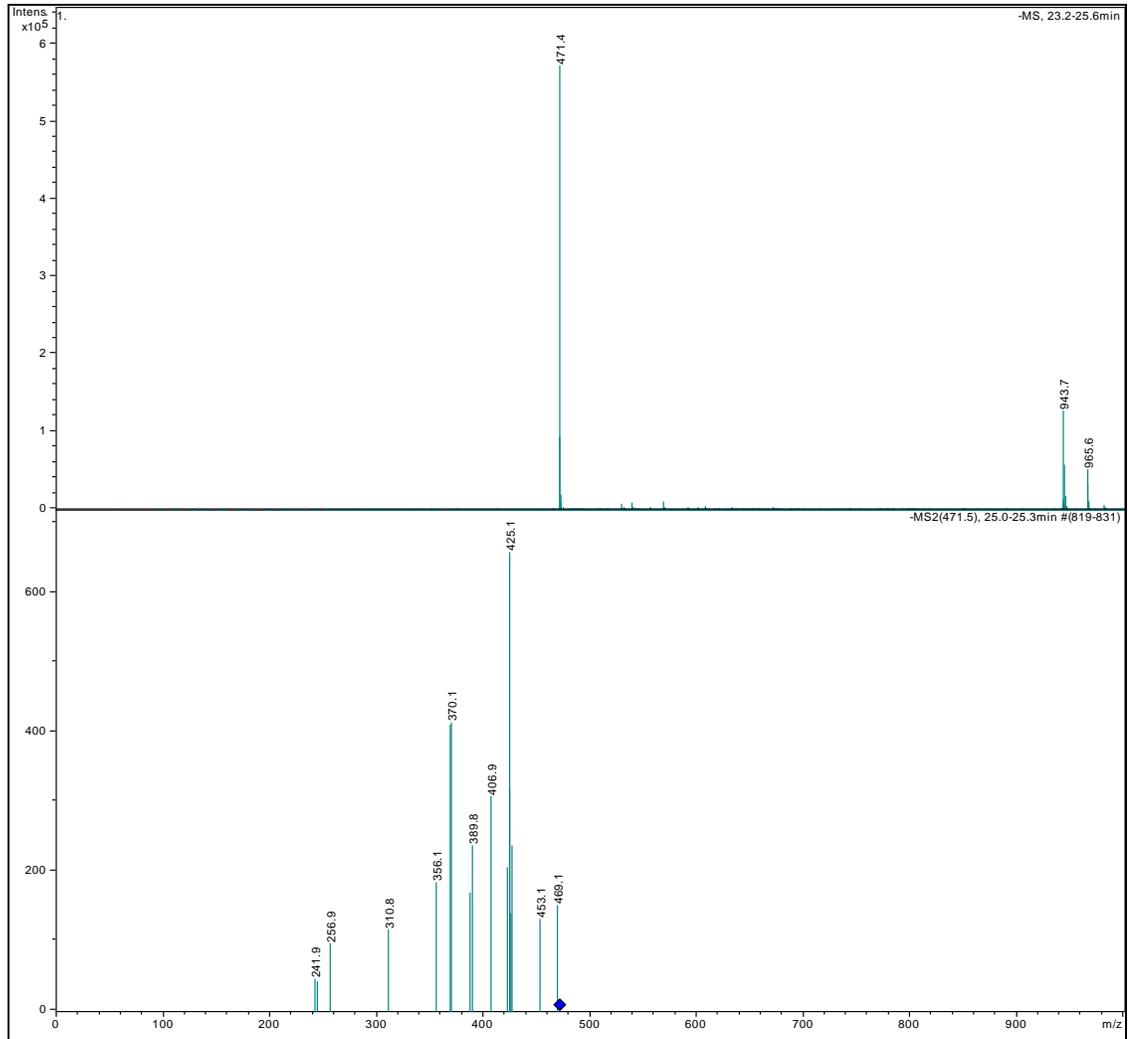
Anexo 2: Espectros de masas por ionización por electro-spray de estándares de triterpenoides pentacíclicos

A2.1. Espectros de masas por ionización por electro-spray de ácido asiático



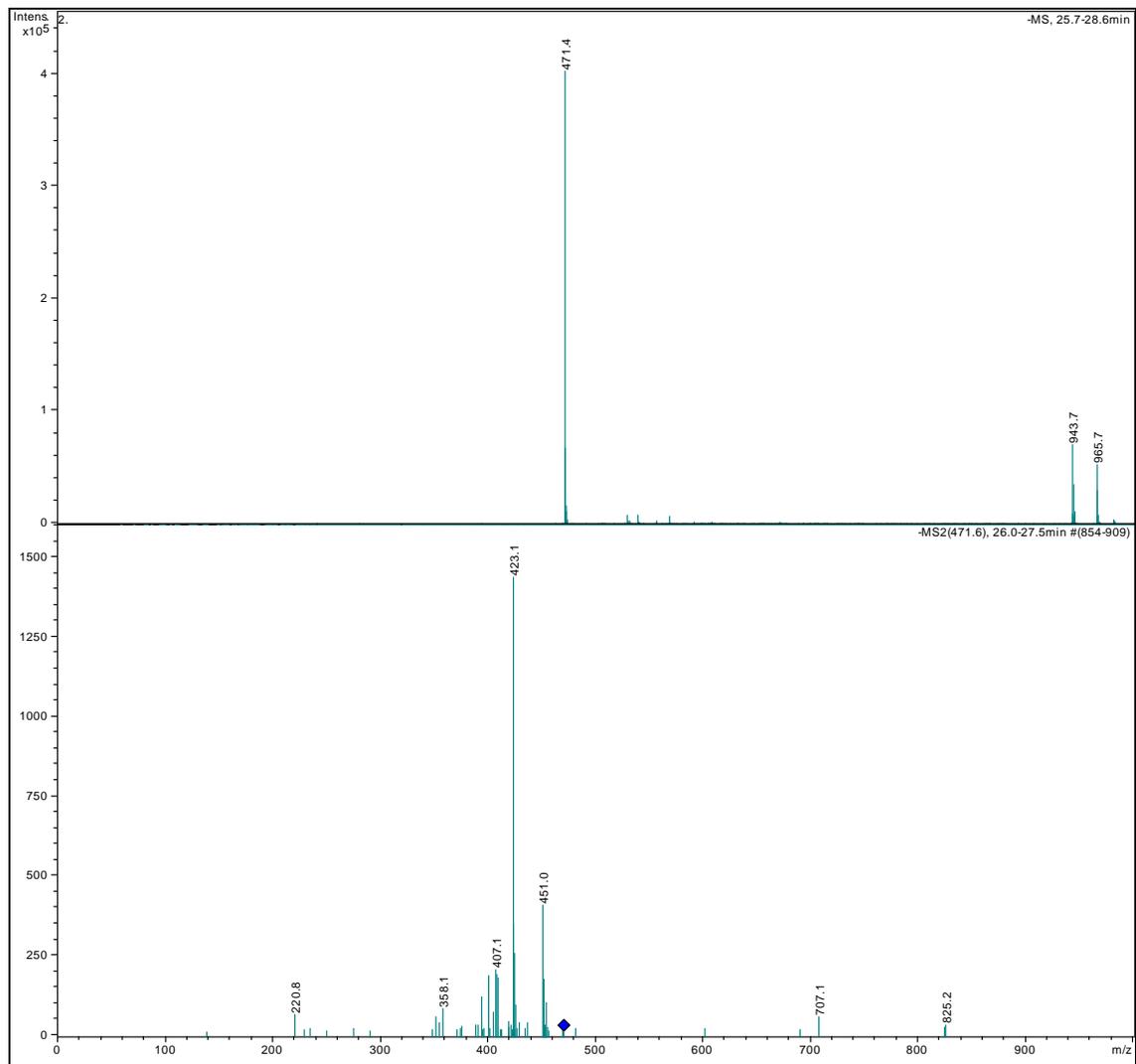
Espectros de masas de detección en modo de ión negativo de MS¹ (superior) y MS² para [M-H]⁻ (inferior)

A2.2. Espectros de masas por ionización por electro-spray de ácido alfitólico



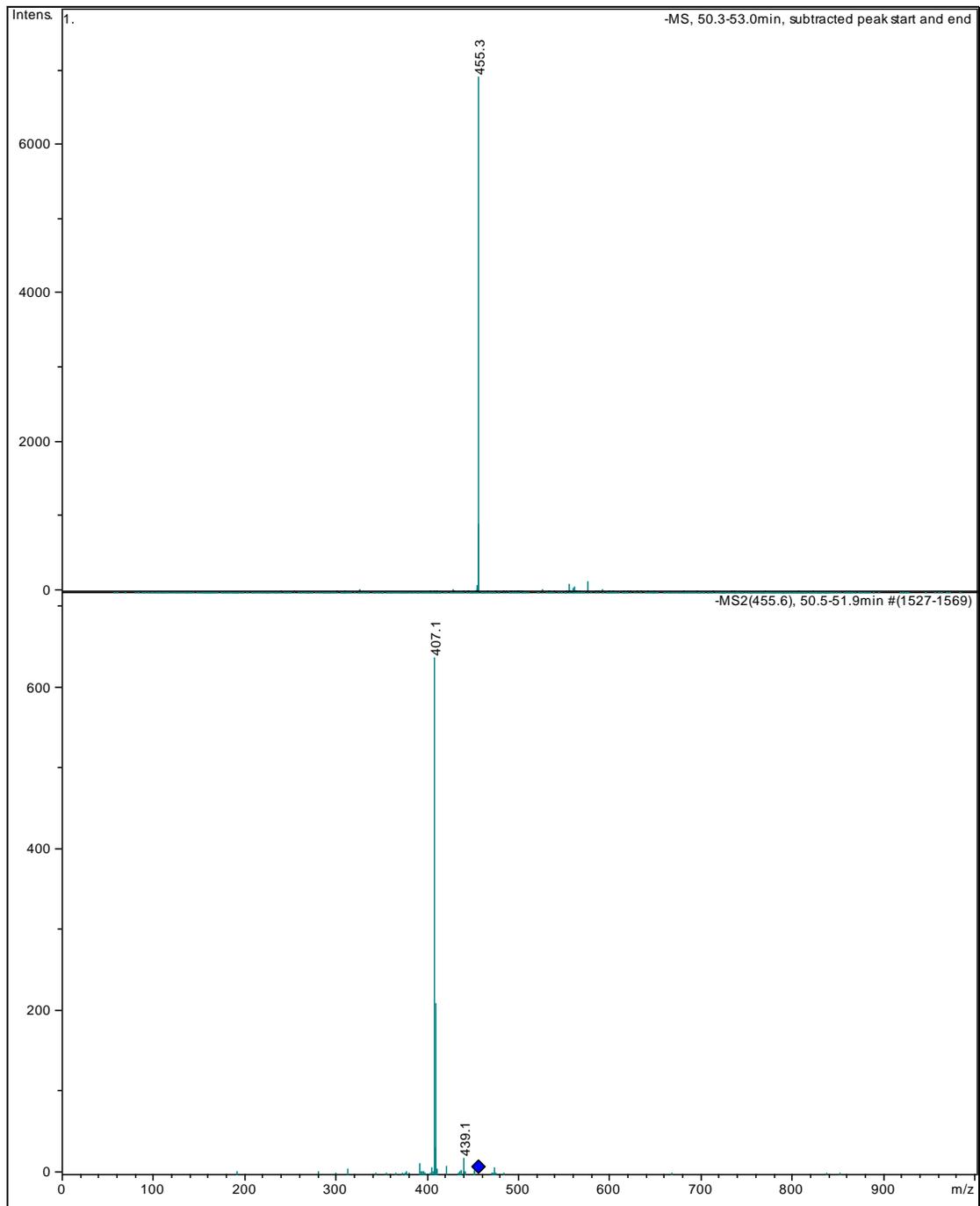
Espectros de masas de detección en modo de ión negativo de MS¹ (superior) y MS² para [M-H]⁻ (inferior)

A2.3. Espectros de masas por ionización por electro-spray de ácido corosólico



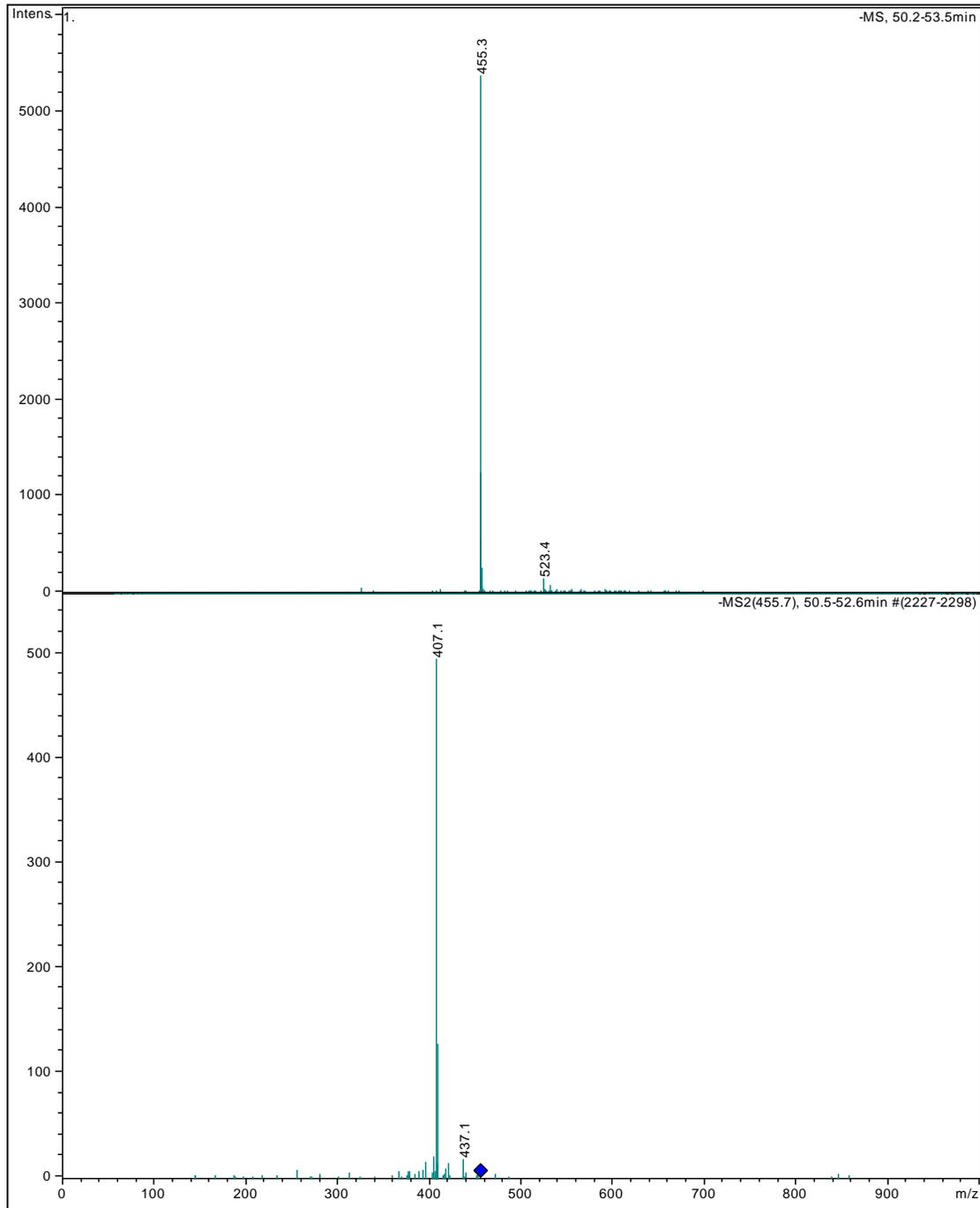
Espectros de masas de detección en modo de ión negativo de MS¹ (superior) y MS² para [M-H]⁻ (inferior)

A2.4. Espectros de masas por ionización por electro-spray de ácido oleanólico



Espectros de masas de detección en modo de ión negativo de MS¹ (superior) y MS² para [M-H]⁻ (inferior)

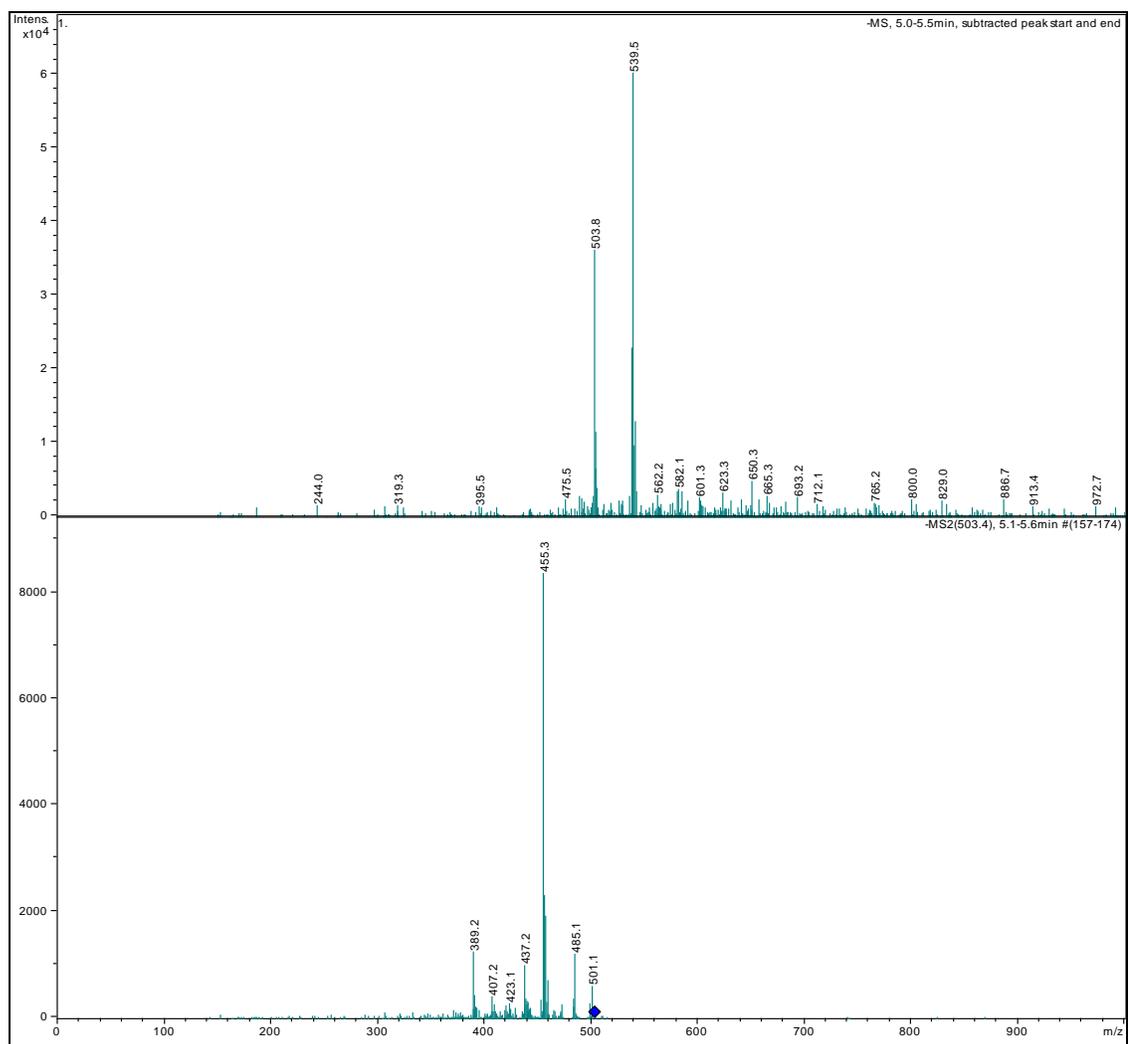
A2.5. Espectros de masas por ionización por electro-spray de la co-elución de los ácidos oleanólico y ursólico



Espectros de masas de detección en modo de ión negativo de MS¹ (superior) y MS² para [M-H]⁻ (inferior)

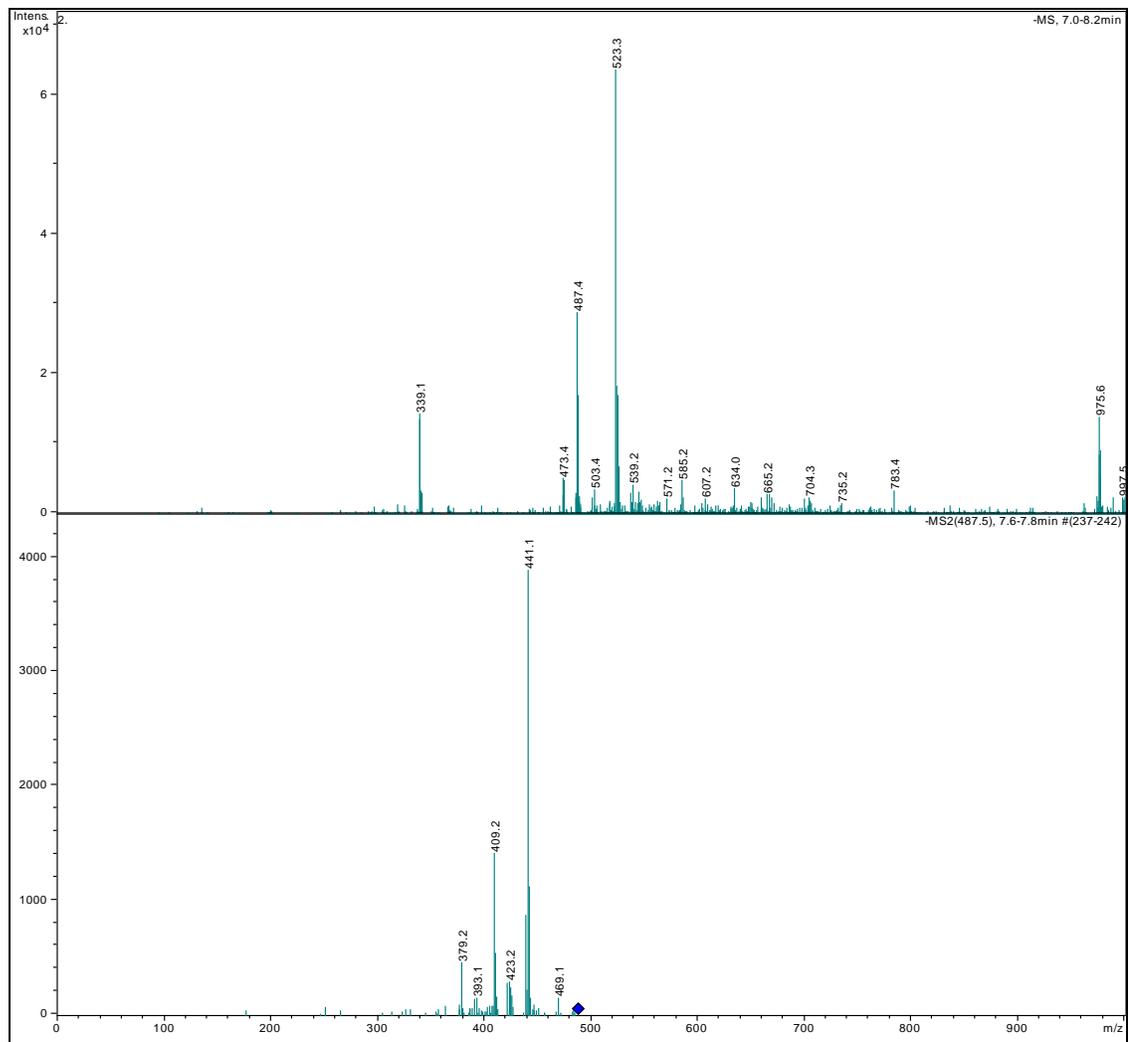
Anexo 3: Espectros de masas por ionización por electro-spray de cada pico de los cromatogramas por CLAE-UV para EAE, SAE y EET (Figura 22)

A3.1. Espectros de masas por ionización por electro-spray del pico 1



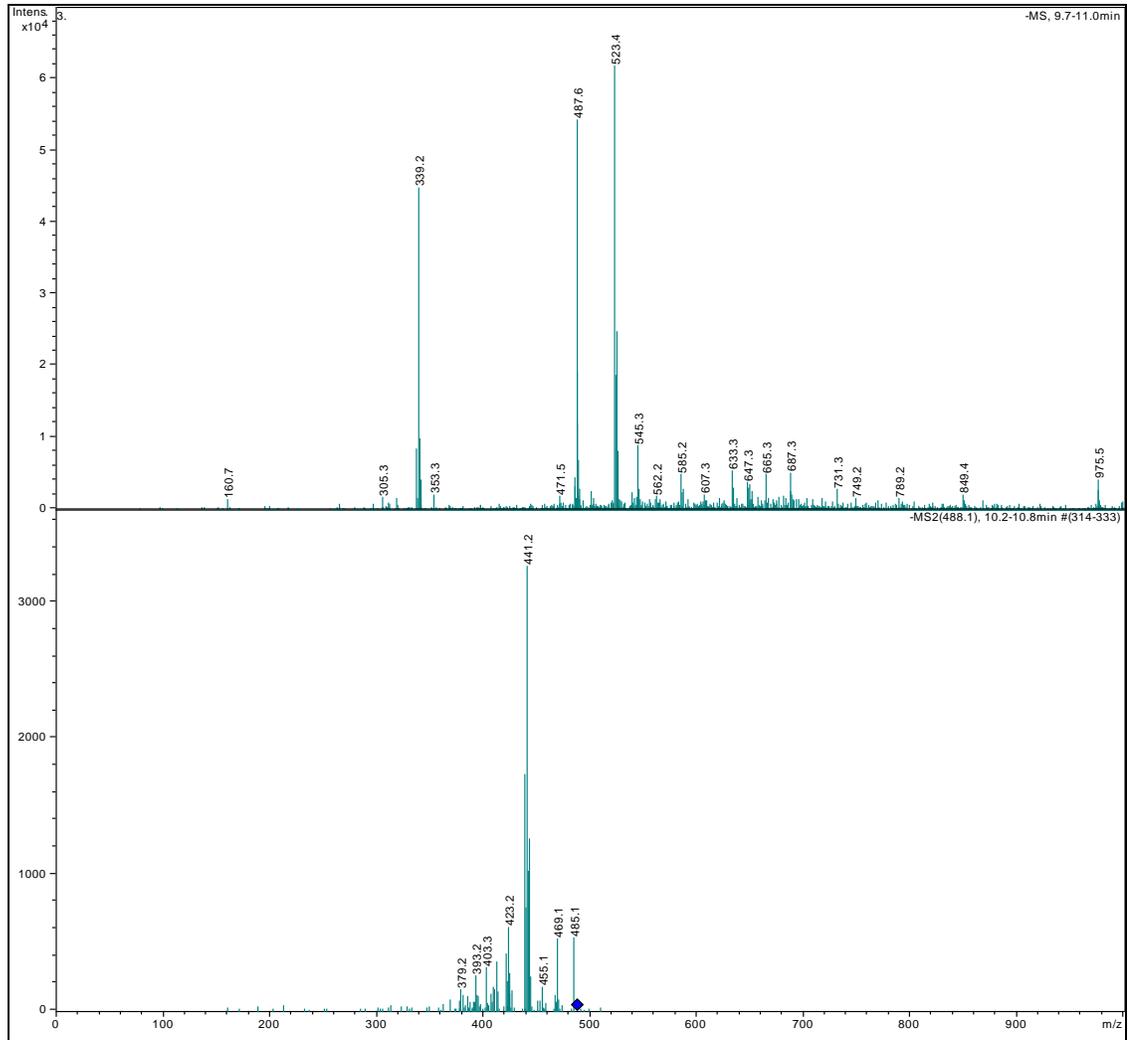
Espectros de masas de detección en modo de ión negativo de MS¹ (superior) y MS² para [M-H]⁻ (inferior)

A3.2. Espectros de masas por ionización por electro-spray del pico 2



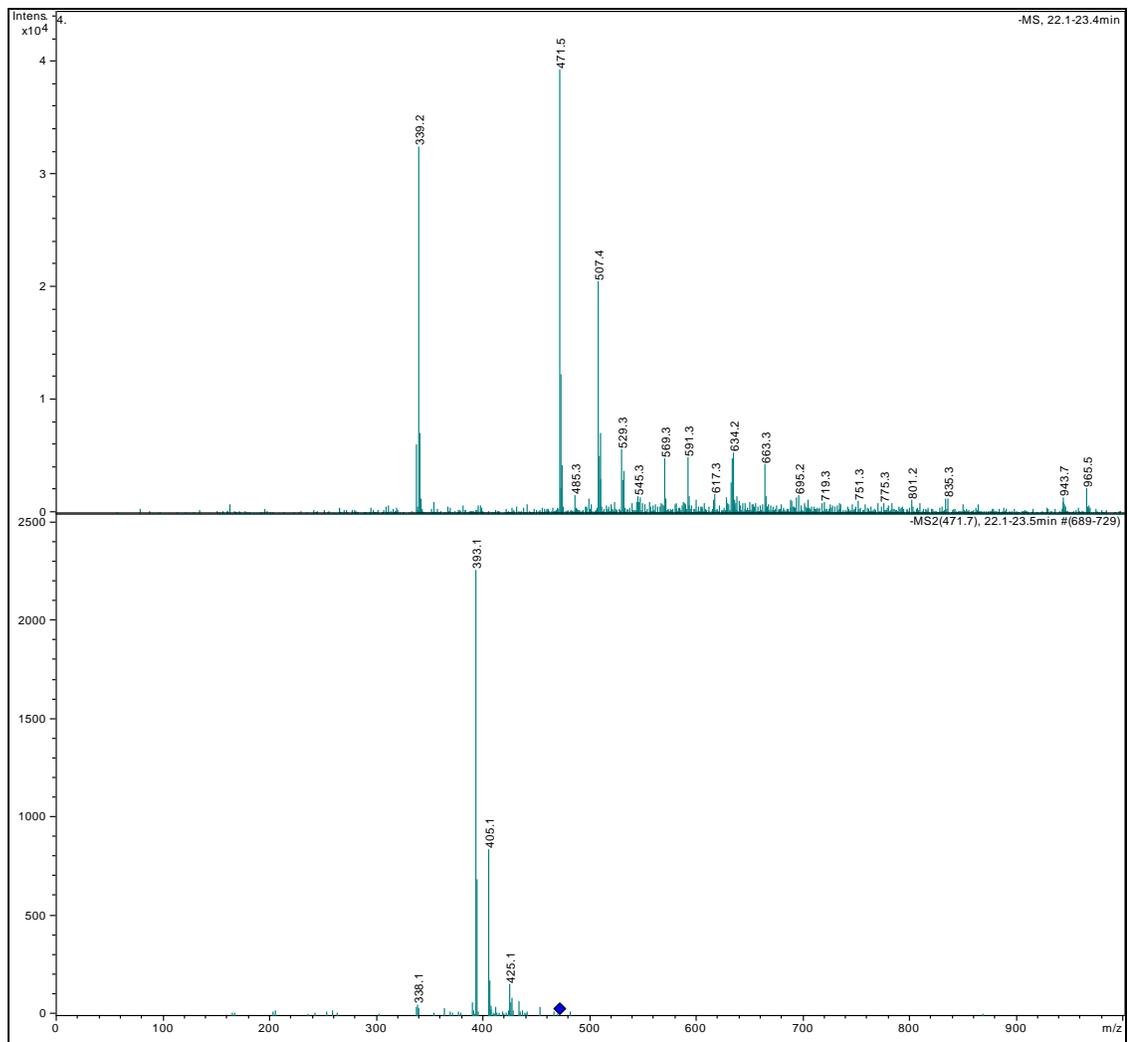
Espectros de masas de detección en modo de ión negativo de MS¹ (superior) y MS² para [M-H]⁻ (inferior)

A3.3. Espectros de masas por ionización por electro-spray del pico 3



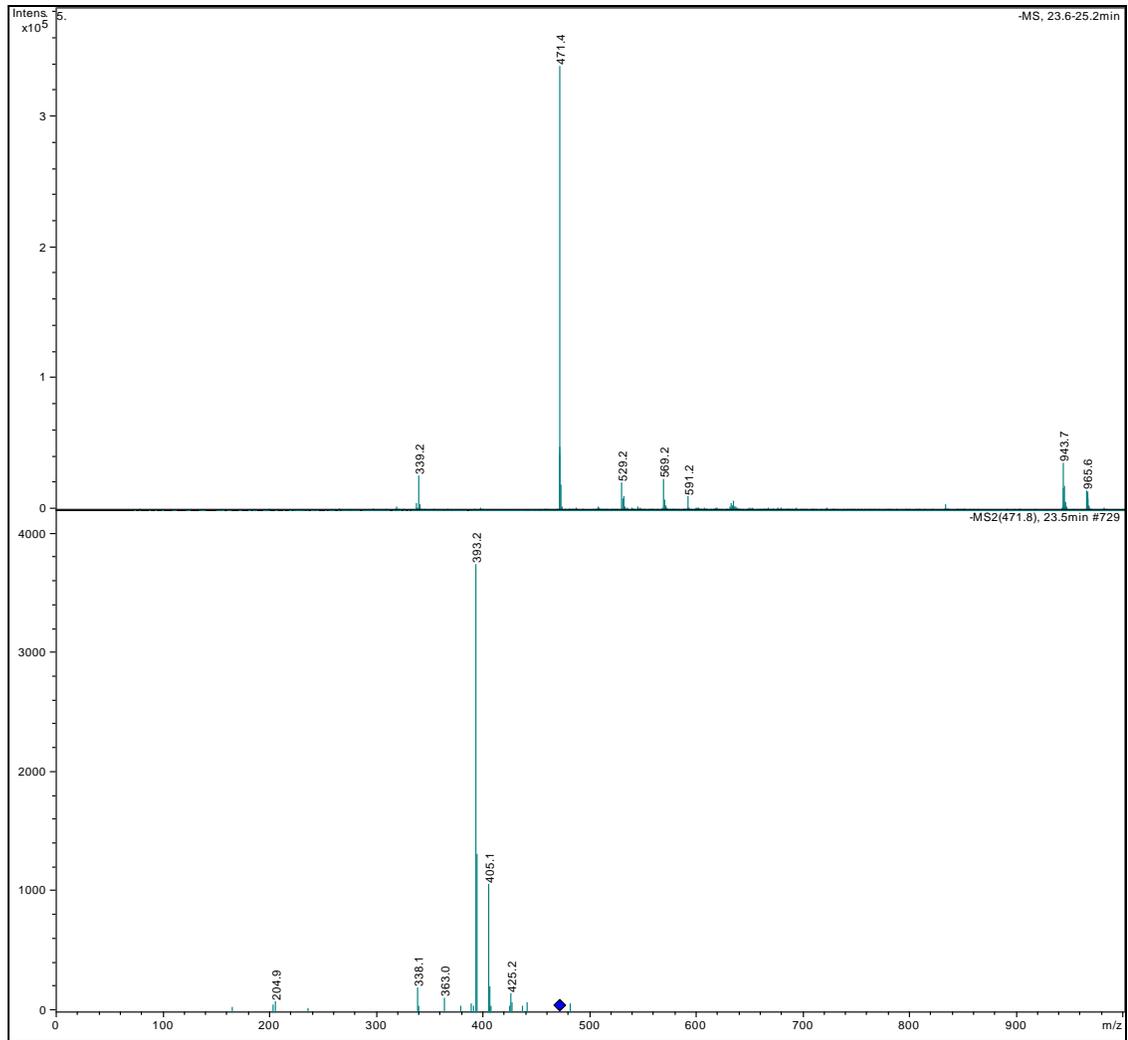
Espectros de masas de detección en modo de ión negativo de MS¹ (superior) y MS² para [M-H]⁻ (inferior)

A3.4. Espectros de masas por ionización por electro-spray del pico 4



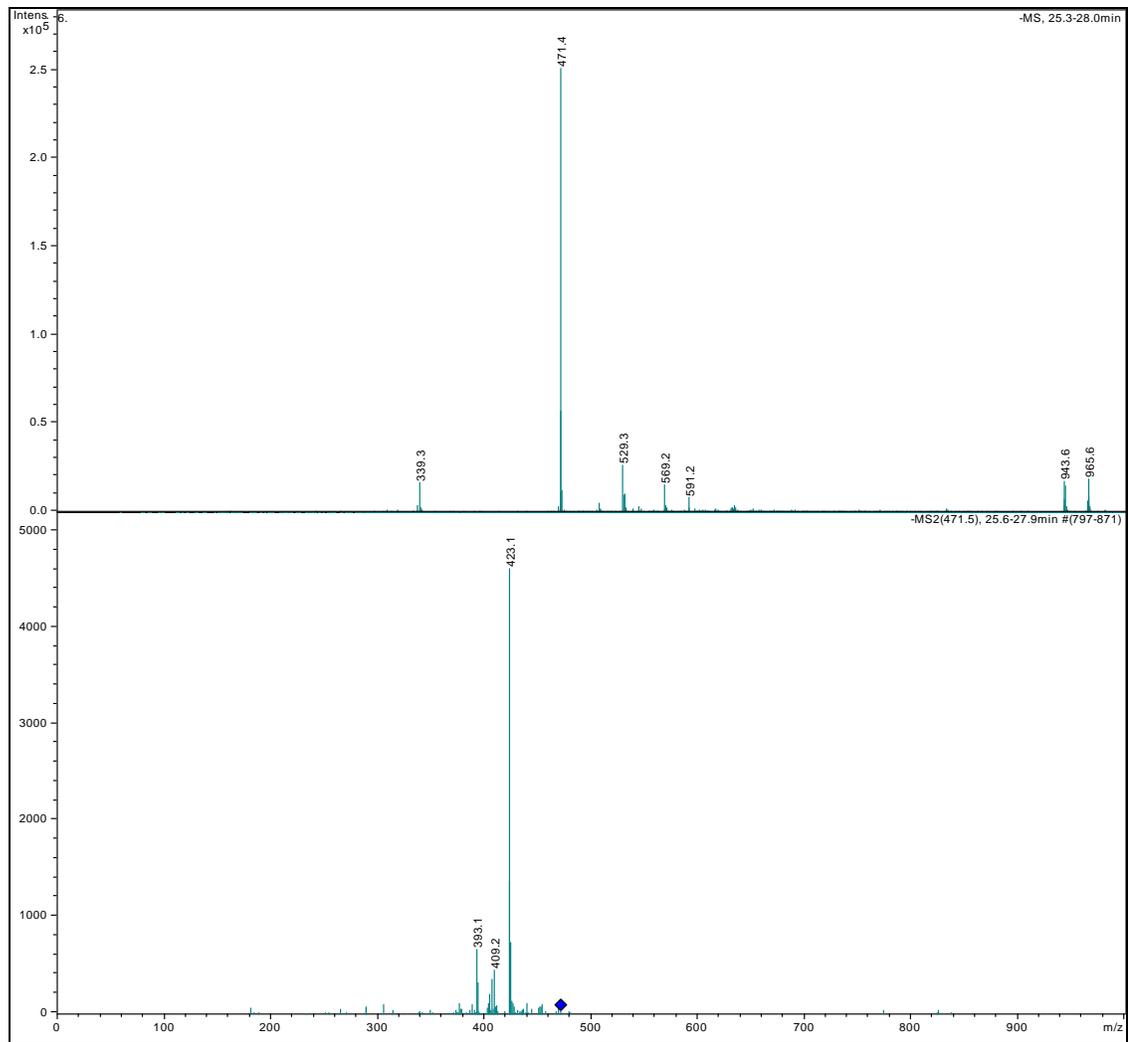
Espectros de masas de detección en modo de ión negativo de MS¹ (superior) y MS² para [M-H]⁻ (inferior)

A3.5. Espectros de masas por ionización por electro-spray del pico 5



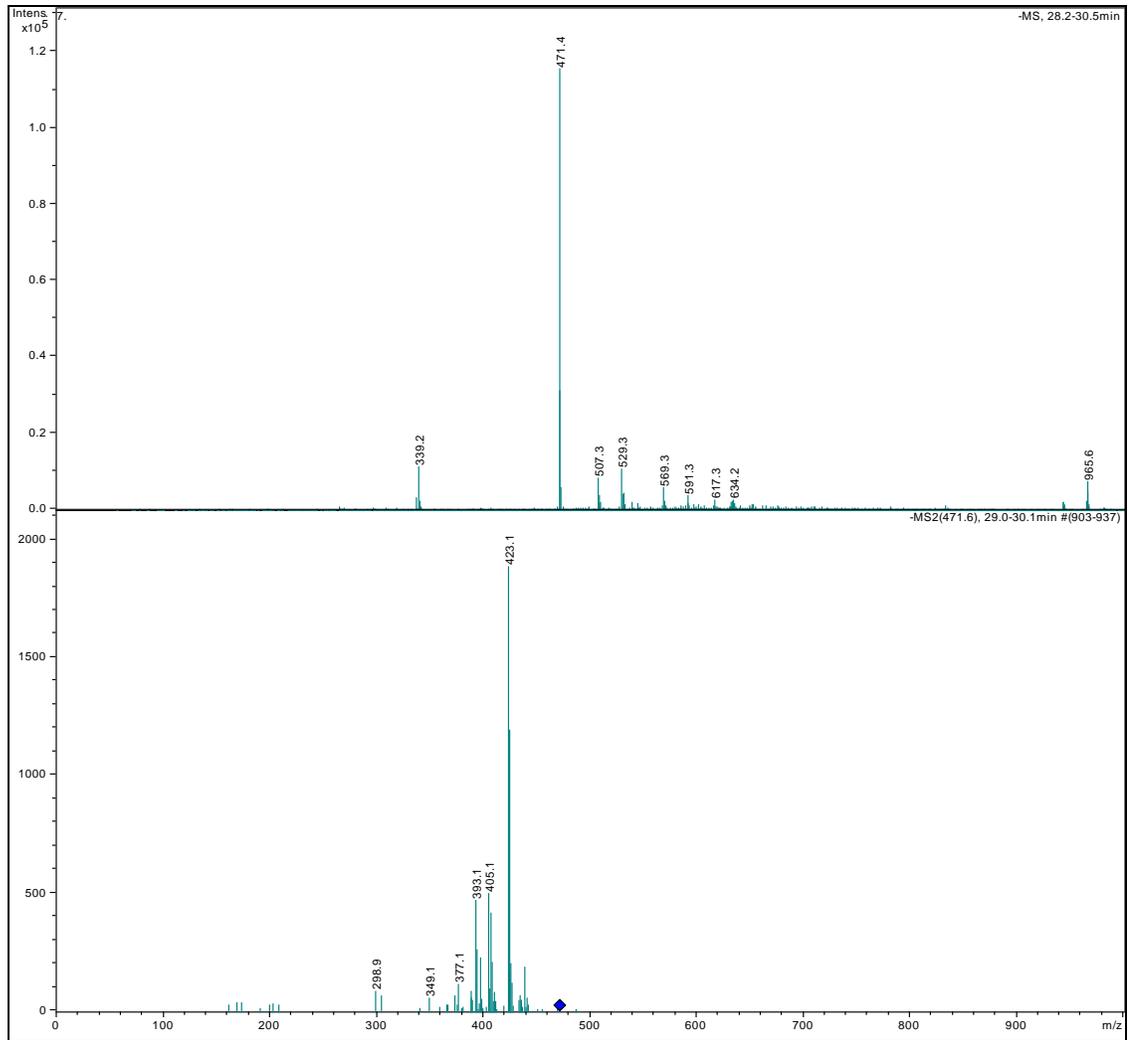
Espectros de masas de detección en modo de ión negativo de MS¹ (superior) y MS² para [M-H]⁻ (inferior)

A3.6. Espectros de masas por ionización por electro-spray del pico 6



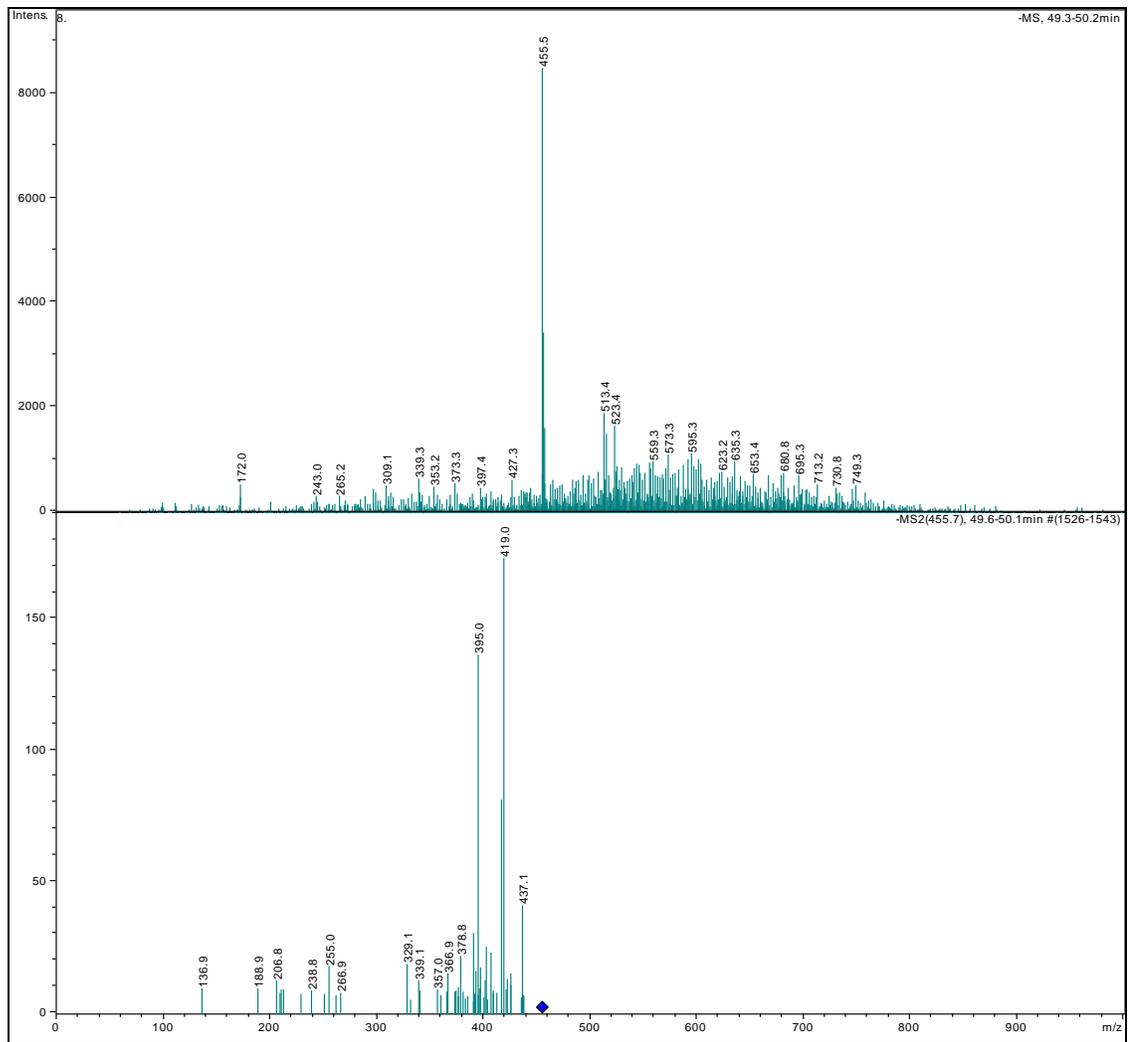
Espectros de masas de detección en modo de ión negativo de MS¹ (superior) y MS² para [M-H]⁻ (inferior)

A3.7. Espectros de masas por ionización por electro-spray del pico 7



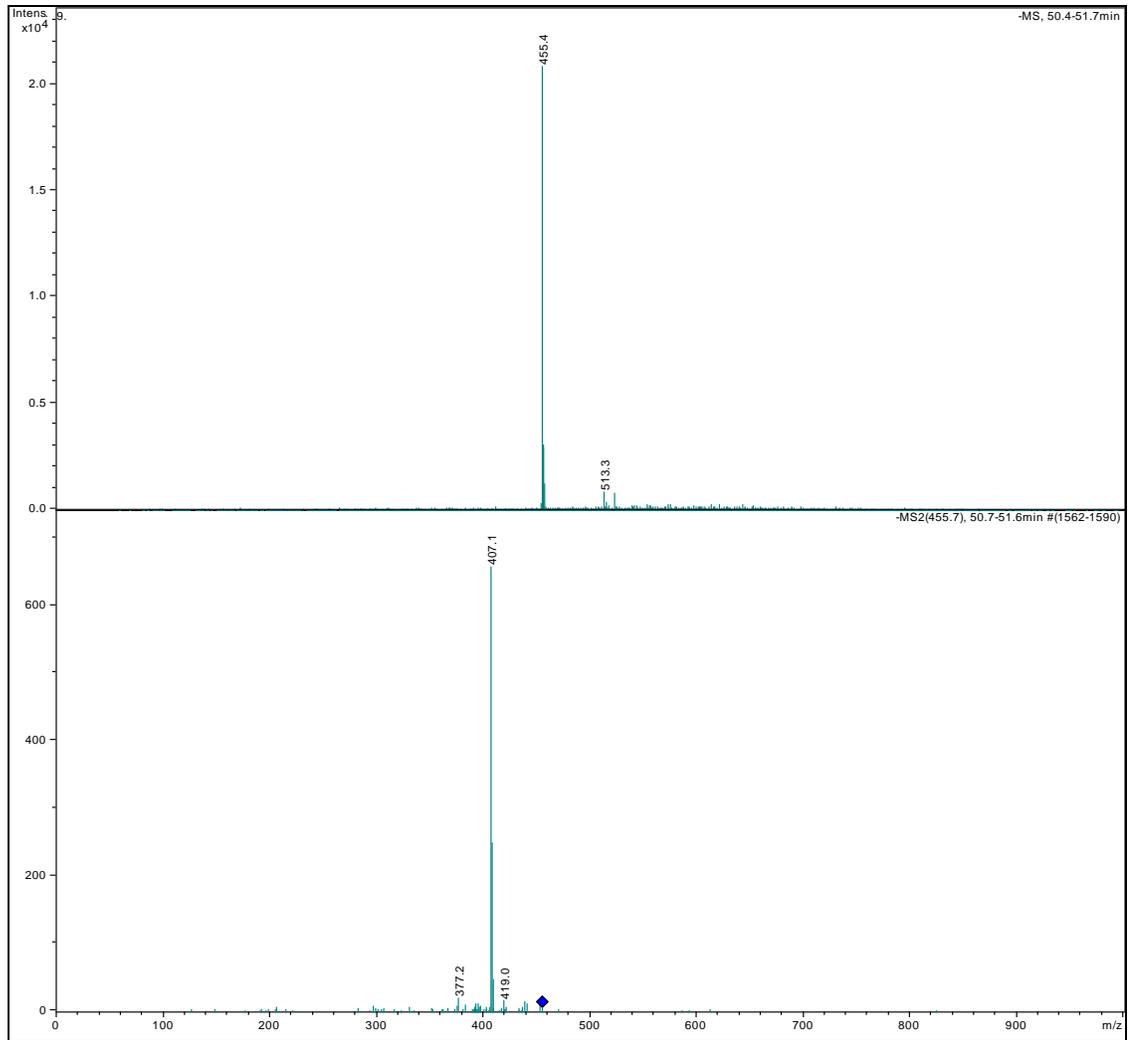
Espectros de masas de detección en modo de ión negativo de MS¹ (superior) y MS² para [M-H]⁻ (inferior)

A3.8. Espectros de masas por ionización por electro-spray del pico 8



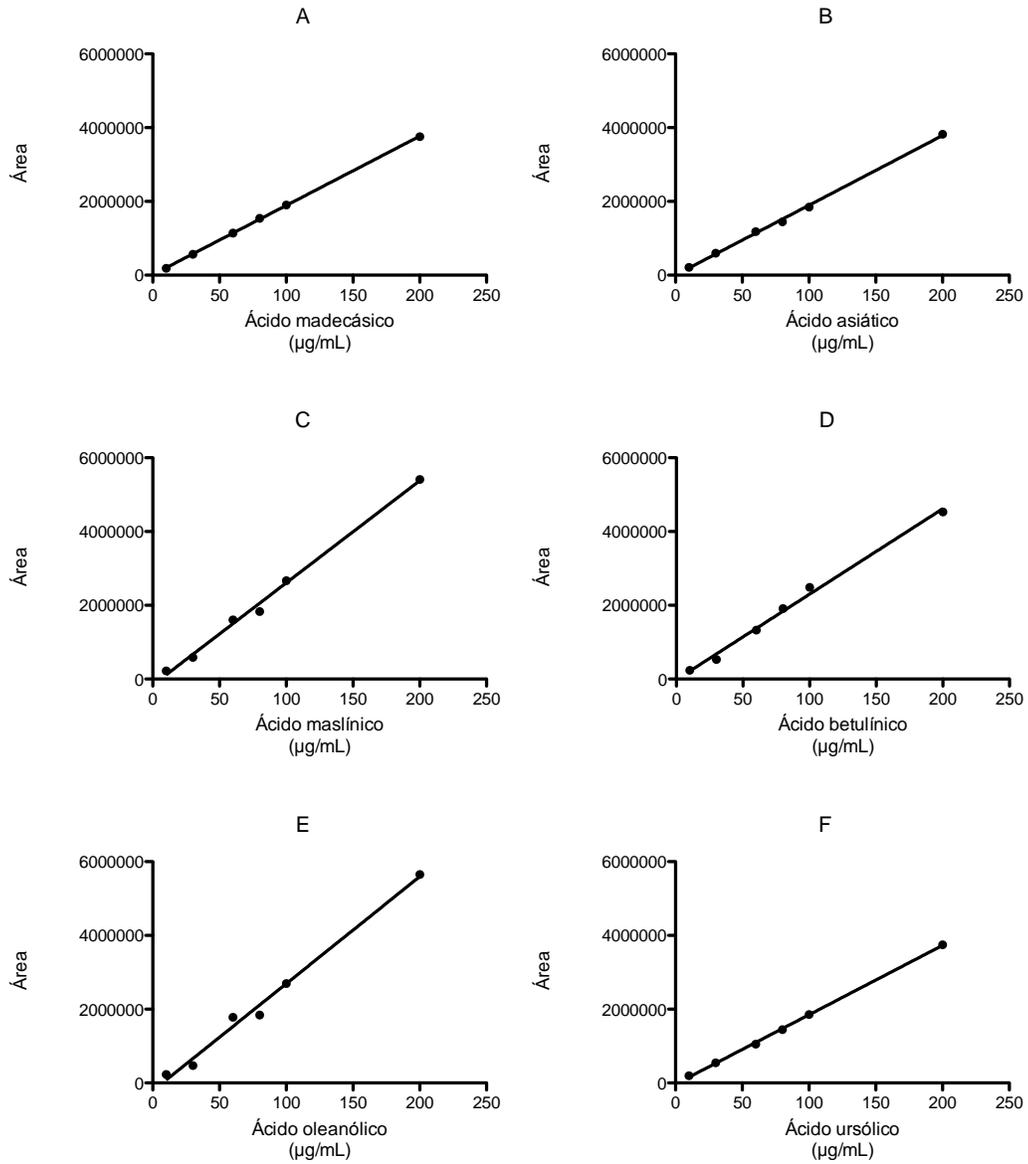
Espectros de masas de detección en modo de ión negativo de MS¹ (superior) y MS² para [M-H]⁻ (inferior)

A3.9. Espectros de masas por ionización por electro-spray del pico 9

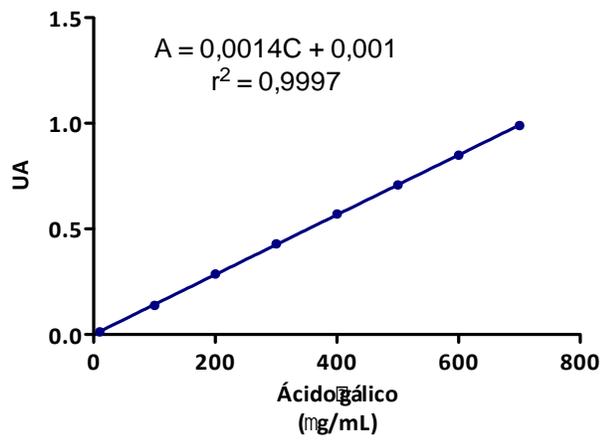


Espectros de masas de detección en modo de ión negativo de MS¹ (superior) y MS² para [M-H]⁻ (inferior)

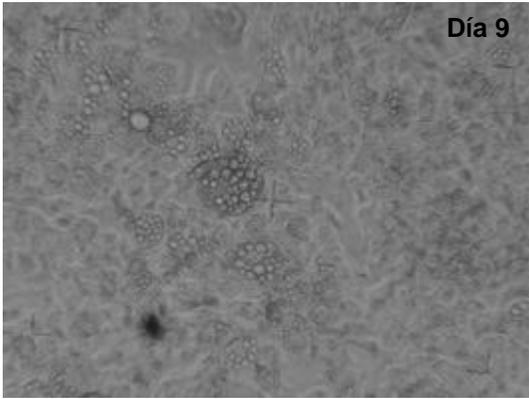
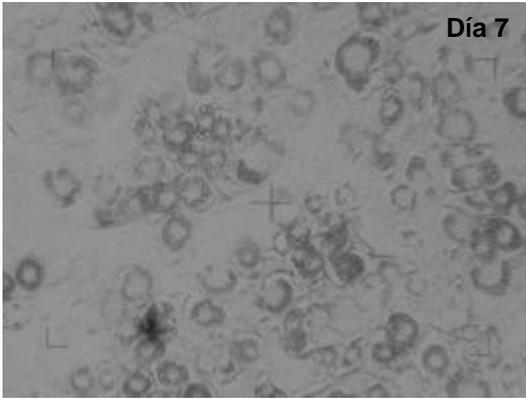
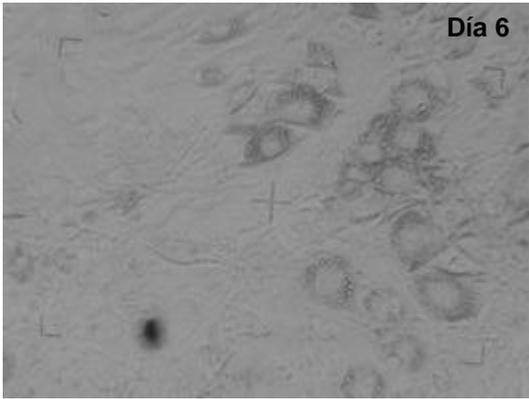
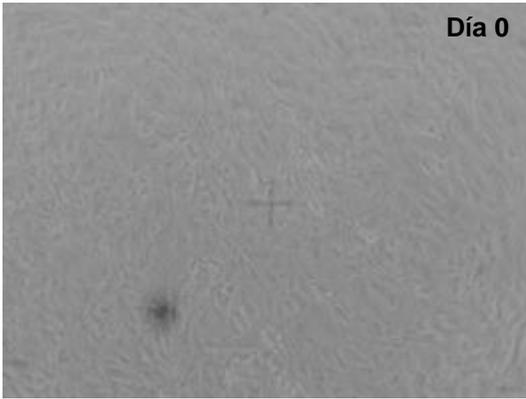
Anexo 4: Curvas de calibración de CLAE-DAD para los patrones primarios de los triterpenoides pentacíclicos presentes en los extractos de *U. molinae*



Anexo 5: Curva de calibración de ácido gálico para la determinación de la cantidad de fenoles totales mediante la reacción de Folin-Ciocalteu



Anexo 6: Micrografías del proceso de diferenciación celular de las células 3T3-L1 a adipocitos



VII. REFERENCIAS

- Aguila, C. y Nahuelhual, L. Cultivo de murtila (*Ugni molinae* Turcz.) como alternativa de diversificación productiva para la agricultura familiar campesina de la cordillera de la costa. Agro Sur, 36 (3): 158-167, 2008.
- Aguirre, M.C., Delporte, C., Backhouse, N., Erazo, S., Letelier, M.E., Cassels, B.K., Silva, X., Alegria, S. y Negrete, R. Topical anti-inflammatory activity of 2alpha-hydroxy pentacyclic triterpene acids from the leaves of *Ugni molinae*. Bioorganic and Medicinal Chemistry, 14 (16): 5673-5677, 2006.
- Ah-Hen, K., Zambra, C.E., Aguero, J.E., Vega-Gálvez, A. y Lemus-Mondaca, R. Moisture Diffusivity Coefficient and Convective Drying Modelling of Murta (*Ugni molinae* Turcz): Influence of Temperature and Vacuum on Drying Kinetics. Food and Bioprocess Technology, 6 (4): 919-930, 2011.
- Alberti, K.G. y Zimmet, P.Z. Definition, diagnosis and classification of diabetes mellitus and its complications. Part 1: diagnosis and classification of diabetes mellitus provisional report of a WHO consultation. Diabetic medicine, 15 (7): 539-553, 1998.
- Annan, K. y Houghton, P.J. Two novel lupane triterpenoids from *Paullinia pinnata* L. with fibroblast stimulatory activity. Journal of Pharmacy and Pharmacology, 62 (5): 663-668, 2010.
- Avello, M., Valdivia, R., Mondaca, M.A., Ordoñez, J.L., Bittner, M. y Becerra, J. Actividad de *Ugni molinae* Turcz. frente a microorganismos de importancia clínica Boletín Latinoamericano y del Caribe de Plantas Medicinales y Aromáticas, 8 (2): 141-144, 2009.
- Banno, N., Akihisa, T., Tokuda, H., Yasukawa, K., Higashihara, H., Ukiya, M., Watanabe, K., Kimura, Y., Hasegawa, J.-I. y Nishino, H. Triterpene acids from the leaves of *Perilla frutescens* and their anti-inflammatory and antitumor-promoting effects. Bioscience, Biotechnology and Biochemistry, 68 (1): 85-90, 2004.
- Banno, N., Akihisa, T., Tokuda, H., Yasukawa, K., Taguchi, Y., Akazawa, H., Ukiya, M., Kimura, Y., Suzuki, T. y Nishino, H. Anti-inflammatory and antitumor-promoting effects of the triterpene acids from the leaves of *Eriobotrya japonica*. Biological and Pharmaceutical Bulletin, 28 (10): 1995-1999, 2005.
- Bartrop, J.A., Owen, T.C., Cory, A.H. y Cory, J.G. 5-(3-carboxymethoxyphenyl)-2-(4,5-dimethylthiazolyl)-3-(4-sulfophenyl)tetrazolium, inner salt (MTS) and related analogs of 3-(4,5-dimethylthiazolyl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) reducing to purple water-soluble formazans as cell-viability indicators. Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters, 1 (11): 611-614, 1991.

- Bonora, E., Kiechl, S., Willeit, J., Oberhollenzer, F., Egger, G., Meigs, J.B., Bonadonna, R.C. y Muggeo, M. Population-based incidence rates and risk factors for type 2 diabetes in white individuals: the Bruneck study. Diabetes, 53 (7): 1782-1789, 2004.
- Bonté, F., Dumas, M., Chaudagne, C. y Meybeck, A. Influence of asiatic acid, madecassic acid, and asiaticoside on human collagen I synthesis. Planta Medica, 60 (2): 133-135, 1994.
- Bravard, A., Bonnard, C., Durand, A., Chauvin, M.A., Favier, R., Vidal, H. y Rieusset, J. Inhibition of xanthine oxidase reduces hyperglycemia-induced oxidative stress and improves mitochondrial alterations in skeletal muscle of diabetic mice. American Journal of Physiology – Endocrinology and Metabolism, 300 (3): E581-591, 2011.
- Bray, H.G. y Thorpe, W.V. Analysis of phenolic compounds of interest in metabolism. En: Methods of Biochemical Analysis. John Wiley & Sons, Inc., 2006, pp. 27-52.
- Brownlee, M. Biochemistry and molecular cell biology of diabetic complications. Nature, 414 (6865): 813-820, 2001.
- Butler, A.E., Janson, J., Bonner-Weir, S., Ritzel, R., Rizza, R.A. y Butler, P.C. Beta-cell deficit and increased beta-cell apoptosis in humans with type 2 diabetes. Diabetes, 52 (1): 102-110, 2003.
- Cardoso, S.M. y Oliveira, C.R. Inhibition of NF-kB renders cells more vulnerable to apoptosis induced by amyloid beta peptides. Free Radical Research, 37 (9): 967-973, 2003.
- Cawthorn, W.P. y Sethi, J.K. TNF-alpha and adipocyte biology. FEBS Letters, 582 (1): 117-131, 2008.
- Chen, Q., Zhang, Y., Zhang, W. y Chen, Z. Identification and quantification of oleanolic acid and ursolic acid in Chinese herbs by liquid chromatography-ion trap mass spectrometry. Biomedical Chromatography, 25 (12): 1381-1388, 2011.
- Crozier, A., Del Rio, D. y Clifford, M.N. Bioavailability of dietary flavonoids and phenolic compounds. Molecular Aspects of Medicine, 31 (6): 446-467, 2010.
- Dandona, P., Aljada, A., Chaudhuri, A., Mohanty, P. y Garg, R. Metabolic syndrome - A comprehensive perspective based on interactions between obesity, diabetes, and inflammation. Circulation, 111 (11): 1448-1454, 2005.
- Delporte, C., Backhouse, N., Inostroza, V., Aguirre, M.C., Peredo, N., Silva, X., Negrete, R. y Miranda, H.F. Analgesic activity of *Ugni molinae* (murtilla) in mice models of acute pain. Journal of Ethnopharmacology, 112 (1): 162-165, 2007.

- Delporte, C., Backhouse, N., Salinas, P., San-Martin, A., Borquez, J. y Loyola, A. Pharmacotoxicological study of diterpenoids. Bioorganic and Medicinal Chemistry, 11 (7): 1187-1190, 2003.
- Fang, X.K., Gao, J. y Zhu, D.N. Kaempferol and quercetin isolated from *Euonymus alatus* improve glucose uptake of 3T3-L1 cells without adipogenesis activity. Life Sciences, 82 (11-12): 615-622, 2008.
- Feitoza, C.Q., Semedo, P., Goncalves, G.M., Cenedeze, M.A., Pinheiro, H.S., Dos Santos, O.F., Landgraf, R.G., Pacheco-Silva, A. y Camara, N.O. Modulation of inflammatory response by selective inhibition of cyclooxygenase-1 and cyclooxygenase-2 in acute kidney injury. Inflammation Research, 59 (3): 167-175, 2010.
- Franck, N., Winkler, S., Pastenes, C. y Infante, R. Acclimation to sun and shade of three accessions of the Chilean native berry-crop murta. Agroforestry Systems, 69 (3): 215-229, 2007.
- Galassi, A., Reynolds, K. y He, J. Metabolic syndrome and risk of cardiovascular disease: a meta-analysis. American Journal of Medicine, 119 (10): 812-819, 2006.
- Gali, H.U., Perchellet, E.M., Klish, D.S., Johnson, J.M. y Perchellet, J.P. Hydrolyzable tannins: potent inhibitors of hydroperoxide production and tumor promotion in mouse skin treated with 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate *in vivo*. International Journal of Cancer, 51 (3): 425-432, 1992.
- Goity, L.E., Queupil, M.J., Jara, D., Alegria, S.E., Pena, M., Barriga, A., Aguirre, M.C. y Delporte, C. An HPLC-UV and HPLC-ESI-MS based method for identification of anti-inflammatory triterpenoids from the extracts of *Ugni molinae*. Boletín Latinoamericano y del Caribe de Plantas Medicinales y Aromáticas, 12 (1): 108-116, 2013.
- Hadjipanayi, E., Mudera, V. y Brown, R.A. Close dependence of fibroblast proliferation on collagen scaffold matrix stiffness. Journal of Tissue Engineering and Regenerative Medicine, 3 (2): 77-84, 2009.
- Halliwell, B. y Whiteman, M. Measuring reactive species and oxidative damage *in vivo* and in cell culture: how should you do it and what do the results mean? British Journal of Pharmacology, 142 (2): 231-255, 2004.
- Hao, J., Zhang, X., Zhang, P., Liu, J., Zhang, L. y Sun, H. Efficient access to isomeric 2,3-dihydroxy lupanes: first synthesis of alphitolic acid. Tetrahedron, 65 (38): 7975-7984, 2009.
- Harmon, A.W. y Harp, J.B. Differential effects of flavonoids on 3T3-L1 adipogenesis and lipolysis. American Journal of Physiology - Cell Physiology, 280 (4): C807-813, 2001.

- Hotamisligil, G.S. Inflammation and metabolic disorders. Nature, 444 (7121): 860-867, 2006.
- Hotamisligil, G.S., Peraldi, P., Budavari, A., Ellis, R., White, M.F. y Spiegelman, B.M. IRS-1-mediated inhibition of insulin receptor tyrosine kinase activity in TNF- α - and obesity-induced insulin resistance. Science, 271 (5249): 665-668, 1996.
- Hotamisligil, G.S., Shargill, N.S. y Spiegelman, B.M. Adipose expression of tumor necrosis factor- α : direct role in obesity-linked insulin resistance. Science, 259 (5091): 87-91, 1993.
- Hsu, Y.L., Kuo, P.L., Lin, L.T. y Lin, C.C. Asiatic acid, a triterpene, induces apoptosis and cell cycle arrest through activation of extracellular signal-regulated kinase and p38 mitogen-activated protein kinase pathways in human breast cancer cells. Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics, 313 (1): 333-344, 2005.
- Huxley, A., Griffiths, M. y Levy, M. *Ugni*. En: The new Royal Horticultural Society dictionary of gardening. New York, Grove's Dictionaries Inc., 1999, 4, pp. 543.
- Ikeda, Y., Murakami, A., Fujimura, Y., Tachibana, H., Yamada, K., Masuda, D., Hirano, K., Yamashita, S. y Ohigashi, H. Aggregated ursolic acid, a natural triterpenoid, induces IL-1 β release from murine peritoneal macrophages: role of CD36. Journal of Immunology, 178 (8): 4854-4864, 2007.
- Ikeda, Y., Murakami, A. y Ohigashi, H. Ursolic acid promotes the release of macrophage migration inhibitory factor via ERK2 activation in resting mouse macrophages. Biochemical Pharmacology, 70 (10): 1497-1505, 2005.
- Jakobs, S., Fridrich, D., Hofem, S., Pahlke, G. y Eisenbrand, G. Natural flavonoids are potent inhibitors of glycogen phosphorylase. Molecular Nutrition and Food Research, 50 (1): 52-57, 2006.
- James, A.M., Collins, Y., Logan, A. y Murphy, M.P. Mitochondrial oxidative stress and the metabolic syndrome. Trends in Endocrinology and Metabolism, 23 (9): 429-434, 2012.
- Kanda, H., Tateya, S., Tamori, Y., Kotani, K., Hiasa, K.-I., Kitazawa, R., Kitazawa, S., Miyachi, H., Maeda, S., Egashira, K. y Kasuga, M. MCP-1 contributes to macrophage infiltration into adipose tissue, insulin resistance, and hepatic steatosis in obesity. The Journal of Clinical Investigation, 116 (6): 1494-1505, 2006.
- Kim, J.J., Lee, S.B., Park, J.K. y Yoo, Y.D. TNF- α -induced ROS production triggering apoptosis is directly linked to Romo1 and Bcl-XL. Cell Death and Differentiation, 17 (9): 1420-1434, 2010.

- Lapidot, T., Walker, M.D. y Kanner, J. Antioxidant and prooxidant effects of phenolics on pancreatic beta-cells *in vitro*. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 50 (25): 7220-7225, 2002.
- Li, E.-N., Luo, J.-G. y Kong, L.-Y. Qualitative and quantitative determination of seven triterpene acids in *Eriobotrya japonica* Lindl. by high-performance liquid chromatography with photodiode array detection and mass spectrometry. Phytochemical Analysis, 20 (4): 338-343, 2009.
- Li, Y., Kang, Z., Li, S., Kong, T., Liu, X. y Sun, C. Ursolic acid stimulates lipolysis in primary-cultured rat adipocytes. Molecular Nutrition and Food Research, 54 (11): 1609-1617, 2010.
- Lira, F.S., Rosa, J.C., Cunha, C.A., Ribeiro, E.B., Do Nascimento, C.O., Oyama, L.M. y Mota, J.F. Supplementing alpha-tocopherol (vitamin E) and vitamin D3 in high fat diet decrease IL-6 production in murine epididymal adipose tissue and 3T3-L1 adipocytes following LPS stimulation. Lipids in Health and Disease, 10: 37, 2011.
- Lloret, S. y Moreno, J.J. Effects of an anti-inflammatory peptide (antiflammin 2) on cell influx, eicosanoid biosynthesis and oedema formation by arachidonic acid and tetradecanoyl phorbol dermal application. Biochemical Pharmacology, 50 (3): 347-353, 1995.
- Lorenzo, C., Okoloise, M., Williams, K., Stern, M.P. y Haffner, S.M. The metabolic syndrome as predictor of type 2 diabetes. Diabetes Care, 26 (11): 3153-3159, 2003.
- Lowell, B.B. y Shulman, G.I. Mitochondrial dysfunction and type 2 diabetes. Science, 307 (5708): 384-387, 2005.
- Maquart, F.-X., Bellon, G., Gillery, P., Wegrowski, Y. y Borel, J.-P. Stimulation of collagen synthesis in fibroblast cultures by a triterpene extracted from *Centella asiatica*. Connective Tissue Research, 24 (2): 107-120, 1990.
- Maquart, F.X., Chastang, F., Simeon, A., Birembaut, P., Gillery, P. y Wegrowski, Y. Triterpenes from *Centella asiatica* stimulate extracellular matrix accumulation in rat experimental wounds. European Journal of Dermatology, 9 (4): 289-296, 1999.
- Middleton, E., Jr., Kandaswami, C. y Theoharides, T.C. The effects of plant flavonoids on mammalian cells: implications for inflammation, heart disease, and cancer. Pharmacological Reviews, 52 (4): 673-751, 2000.
- Montenegro, G. En: Chile nuestra flora útil: guía de plantas de uso apícola, en medicina folklórica, artesanal y ornamental. 1. Santiago, Chile, Universidad Católica de Chile, 2000, pp. 241-242.

- Montenegro, G., Kornfeld, R. y Rioseco, V. Infusión para suavizar cutis reseco. En: Secretos de nuestras plantas y otras especies: Como usarlas en beneficio de las personas. Segunda edición. Santiago, Chile, Universidad Católica de Chile, 2005, p. 63.
- Montes, M. y Wilkomirsky, T. Plantas usadas como remedios en Chile. En: Medicina tradicional chilena. Concepción, Chile, Editorial de la Universidad de Concepción, 1985, pp. 18.
- Nagao, A., Seki, M. y Kobayashi, H. Inhibition of xanthine oxidase by flavonoids. Bioscience, Biotechnology and Biochemistry, 63 (10): 1787-1790, 1999.
- Naik, S.R. y Kokil, G.R. Chapter 12 - Development and Discovery Avenues in Bioactive Natural Products for Glycemic Novel Therapeutics. En: Studies in Natural Products Chemistry. Amsterdam, Holanda, Elsevier, 2013, Volume 39, pp. 431-466.
- Noro, T., Ohki, T., Noda, Y., Warashina, T., Noro, K., Tomita, I. y Nakamura, Y. Inhibitory effects of hydrolyzable tannins on tumor promoting activities induced by 12-O-tetradecanoyl-phorbol-13-acetate (TPA) in JB6 mouse epidermal cells. Basic Life Sciences, 66: 665-673, 1999.
- Parveen, Z., Deng, Y., Saeed, M.K., Dai, R., Ahamad, W. y Yu, Y.H. Antiinflammatory and analgesic activities of *Thesium chinense* Turcz extracts and its major flavonoids, kaempferol and kaempferol-3-O-glucoside. Yakugaku Zasshi, 127 (8): 1275-1279, 2007.
- Pham, C.G., Bubici, C., Zazzeroni, F., Papa, S., Jones, J., Alvarez, K., Jayawardena, S., De Smaele, E., Cong, R., Beaumont, C., Torti, F.M., Torti, S.V. y Franzoso, G. Ferritin heavy chain upregulation by NF-kappaB inhibits TNFalpha-induced apoptosis by suppressing reactive oxygen species. Cell, 119 (4): 529-542, 2004.
- Pisha, E., Chai, H., Lee, I.-S., Chagwedera, T.E., Farnsworth, N.R., Cordell, G.A., Beecher, C.W.W., Fong, H.H.S., Kinghorn, A.D., Brown, D.M., Wani, M.C., Wall, M.E., Hieken, T.J., Das Gupta, T.K. y Pezzuto, J.M. Discovery of betulinic acid as a selective inhibitor of human melanoma that functions by induction of apoptosis. Nature Medicine, 1 (10): 1046-1051, 1995.
- Rafamantanana, M.H., Rozet, E., Raelison, G.E., Cheuk, K., Ratsimamanga, S.U., Hubert, P. y Quetin-Leclercq, J. An improved HPLC-UV method for the simultaneous quantification of triterpenic glycosides and aglycones in leaves of *Centella asiatica* (L.) Urb (APIACEAE). Journal of Chromatography B, 877 (23): 2396-2402, 2009.
- Reyes-Zurita, F.J., Pachón-Peña, G., Lizárraga, D., Rufino-Palomares, E.E., Cascante, M. y Lupiáñez, J.A. The natural triterpene maslinic acid induces apoptosis in HT29 colon cancer cells by a JNK-p53-dependent mechanism. BMC Cancer, 11: 154, 2011.

- Ross, R. y Després, J.P. Abdominal obesity, insulin resistance, and the metabolic syndrome: contribution of physical activity/exercise. Obesity, 17 (Suppl 3): S1-2, 2009.
- Rubilar, M., Pinelo, M., Ihl, M., Scheuermann, E., Sineiro, J. y Nuñez, M.J. Murta leaves (*Ugni molinae* Turcz) as a source of antioxidant polyphenols. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 54 (1): 59-64, 2005.
- Rubilar, M.N., Jara, C., Poo, Y., Acevedo, F., Gutierrez, C., Sineiro, J. y Shene, C. Extracts of maqui (*Aristotelia chilensis*) and murta (*Ugni molinae* Turcz.): Sources of antioxidant compounds and α -glucosidase/ α -amylase inhibitors. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 59 (5): 1630-1637, 2011.
- Rumalla, C.S., Ali, Z., Weerasooriya, A.D., Smillie, T.J. y Khan, I.A. Two new triterpene glycosides from *Centella asiatica*. Planta Medica, 76 (10): 1018-1021, 2010.
- Rush, W.R., Murray, G.R. y Graham, D.J. The comparative steady-state bioavailability of the active ingredients of Madecassol. European Journal of Drug Metabolism and Pharmacokinetics, 18 (4): 323-326, 1993.
- Scheuermann, E., Seguel, I., Montenegro, A., Bustos, R.O., Hormazábal, E. y Quiroz, A. Evolution of aroma compounds of murtila fruits (*Ugni molinae* Turcz) during storage. Journal of the Science of Food and Agriculture, 88 (3): 485-492, 2008.
- Schreckinger, M.E., Lotton, J., Lila, M.A. y Gonzalez De Mejia, E. Berries from South America: A comprehensive review on chemistry, health potential and commercialization. Journal of Medicinal Food, 13 (2): 233-346, 2010.
- Seguel, I. y Montenegro, A. Murtila plant named "Red Pearl-INIA". Instituto De Investigaciones Agropecuarias. USA. US PP21,273 P3. Sep. 7, 2010
- Senn, J.J., Klover, P.J., Nowak, I.A. y Mooney, R.A. Interleukin-6 induces cellular insulin resistance in hepatocytes. Diabetes, 51 (12): 3391-3399, 2002.
- Shene, C., Canquil, N., Jorquera, M., Pinelo, M., Rubilar, M., Acevedo, F., Vergara, C., Von Baer, D. y Mardones, C. *In vitro* activity on human gut bacteria of murta leaf extracts (*Ugni molinae* Turcz.), a native plant from southern Chile. Journal of Food Science, 77 (6): M323-M329, 2012.
- Singleton, V.L. y Rossi, J.A. Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents. American Journal of Enology and Viticulture, 16 (3): 144-158, 1965.
- Souza, S.C., Yamamoto, M.T., Franciosa, M.D., Lien, P. y Greenberg, A.S. BRL 49653 blocks the lipolytic actions of tumor necrosis factor- α : a potential new insulin-sensitizing mechanism for thiazolidinediones. Diabetes, 47 (4): 691-695, 1998.

- Sung, H.Y., Kang, S.W., Kim, J.L., Li, J., Lee, E.S., Gong, J.H., Han, S.J. y Kang, Y.H. Oleanolic acid reduces markers of differentiation in 3T3-L1 adipocytes. Nutrition Research, 30 (12): 831-839, 2010.
- Takada, K., Nakane, T., Masuda, K. y Ishii, H. Ursolic acid and oleanolic acid, members of pentacyclic triterpenoid acids, suppress TNF- α -induced E-selectin expression by cultured umbilical vein endothelial cells. Phytomedicine, 17 (14): 1114-1119, 2010.
- Tawaha, K., Alali, F.Q., Gharaibeh, M., Mohammad, M. y El-Elimat, T. Antioxidant activity and total phenolic content of selected Jordanian plant species. Food Chemistry, 104 (4): 1372-1378, 2007.
- Thurnher, D., Turhani, D., Pelzmann, M., Wannemacher, B., Knerer, B., Formanek, M., Wacheck, V. y Selzer, E. Betulinic acid: a new cytotoxic compound against malignant head and neck cancer cells. Head and Neck, 25 (9): 732-740, 2003.
- Tiedge, M., Lortz, S., Drinkgern, J. y Lenzen, S. Relation between antioxidant enzyme gene expression and antioxidative defense status of insulin-producing cells. Diabetes, 46 (11): 1733-1742, 1997.
- Tilg, H. y Moschen, A.R. Adipocytokines: mediators linking adipose tissue, inflammation and immunity. Nature Reviews - Immunology, 6 (10): 772-783, 2006.
- Toker, G., Küpeli, E., Memisoğlu, M. y Yesilada, E. Flavonoids with antinociceptive and anti-inflammatory activities from the leaves of *Tilia argentea* (silver linden). Journal of Ethnopharmacology, 95 (2-3): 393-397, 2004.
- Wang, H. y Joseph, J.A. Quantifying cellular oxidative stress by dichlorofluorescein assay using microplate reader. Free Radical Biology and Medicine, 27 (5-6): 612-616, 1999.
- Weisberg, S.P., McCann, D., Desai, M., Rosenbaum, M., Leibel, R.L. y Ferrante, A.W., Jr. Obesity is associated with macrophage accumulation in adipose tissue. The Journal of Clinical Investigation, 112 (12): 1796-1808, 2003.
- 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. y 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, 51 (12): 3540-3554, 2008.
- Wilkinson, B.L., Cramer, P.E., Varvel, N.H., Reed-Geaghan, E., Jiang, Q., Szabo, A., Herrup, K., Lamb, B.T. y Landreth, G.E. Ibuprofen attenuates oxidative damage through NOX2 inhibition in Alzheimer's disease. Neurobiology of Aging, 33 (1): 197.e121-197.e132, 2012.

- Won, J.H., Shin, J.S., Park, H.J., Jung, H.J., Koh, D.J., Jo, B.G., Lee, J.Y., Yun, K. y Lee, K.T. Anti-inflammatory effects of madecassic acid via the suppression of NF-kappaB pathway in LPS-induced RAW 264.7 macrophage cells. Planta Medica, 76 (3): 251-257, 2010a.
- Won, S.J., Ki, Y.S., Chung, K.S., Choi, J.H., Bae, K.H. y Lee, K.T. 3alpha,23-isopropylidenedioxyolean-12-en-27-oic acid, a triterpene isolated from *Aceriphyllum rossii*, induces apoptosis in human cervical cancer HeLa cells through mitochondrial dysfunction and endoplasmic reticulum stress. Biological and Pharmaceutical Bulletin, 33 (9): 1620-1626, 2010b.
- Xu, H., Barnes, G.T., Yang, Q., Tan, G., Yang, D., Chou, C.J., Sole, J., Nichols, A., Ross, J.S., Tartaglia, L.A. y Chen, H. Chronic inflammation in fat plays a crucial role in the development of obesity-related insulin resistance. The Journal of Clinical Investigation, 112 (12): 1821-1830, 2003.
- Yasukawa, K., Yu, S.Y., Yamanouchi, S., Takido, M., Akihisa, T. y Tamura, T. Some lupane-type triterpenes inhibit tumor promotion by 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate in two-stage carcinogenesis in mouse skin. Phytomedicine, 1 (4): 309-313, 1995.
- Yin, M.-C. Anti-glycative potential of triterpenes: A mini-review. Biomedicine, 2 (1): 2-9, 2012.
- Yin, M.C. y Chan, K.C. Nonenzymatic antioxidative and antiglycative effects of oleanolic acid and ursolic acid. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 55 (17): 7177-7181, 2007.
- Yin, M.C., Lin, M.C., Mong, M.C. y Lin, C.Y. Bioavailability, distribution, and antioxidative effects of selected triterpenes in mice. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 60 (31): 7697-7701, 2012.
- You, H.J., Choi, C.Y., Kim, J.Y., Park, S.J., Hahm, K.S. y Jeong, H.G. Ursolic acid enhances nitric oxide and tumor necrosis factor-alpha production via nuclear factor-kappaB activation in the resting macrophages. FEBS Letters, 509 (2): 156-160, 2001.
- Yun, K.-J., Kim, J.-Y., Kim, J.-B., Lee, K.-W., Jeong, S.-Y., Park, H.-J., Jung, H.-J., Cho, Y.-W., Yun, K. y Lee, K.-T. Inhibition of LPS-induced NO and PGE2 production by asiatic acid via NF-kB inactivation in RAW 264.7 macrophages: Possible involvement of the IKK and MAPK pathways. International Immunopharmacology, 8 (3): 431-441, 2008.
- Zeng, G., Chen, J., Liang, Q.H., You, W.H., Wu, H.J. y Xiong, X.G. Ursolic acid inhibits T-cell activation through modulating nuclear factor-kappa B signaling. Chinese Journal of Integrative Medicine, 18 (1): 34-39, 2012.

Zong, W. y Zhao, G. Corosolic acid isolation from the leaves of *Eriobotrya japonica* showing the effects on carbohydrate metabolism and differentiation of 3T3-L1 adipocytes. Asia Pacific Journal of Clinical Nutrition, 16 (Suppl 1): 346-352, 2007.